

Daniella de Sousa Moraes

**Análise da região promotora dos genes 1,3- β -glicana
sintase e quitina sintase 4 de *Paracoccidioides brasiliensis***

Brasília, DF

2009

Daniella de Sousa Moraes

Análise da região promotora dos genes 1,3- β -glicana sintase e quitina sintase 4 de *Paracoccidioides brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Ildinete Silva Pereira

Brasília DF,

2009

Daniella de Sousa Moraes

**Análise da região promotora dos genes 1,3- β -glicana
sintase e quitina sintase 4 de *Paracoccidioides brasiliensis***

Banca Examinadora

Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares - Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Cezar Martins de Sá - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Túlio César Ferreira (suplente) - Universidade de Brasília

Brasília, DF

2009

**"Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina."**

Cora Coralina

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Tiana e Luiz, que me ofereceram o amor e suporte necessário para que eu chegasse até aqui, e ao meu marido, Diogo, pelo amor e apoio durante a realização deste desafio.

AGRADECIMENTOS

Aos professores e colegas do Laboratório de Biologia Molecular da UnB, onde tive a oportunidade de realizar este projeto, aprender e amadurecer.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao professor Marcio José Poças Fonseca, pelo apoio e compromisso dedicado à orientação deste trabalho.

À professora Ildinete Silva Pereira, sempre solícita e atenciosa, por ter me recebido no Laboratório de Biologia Molecular, pelo respeito e auxílio.

Aos membros do Lab3, que por lá passaram ou ainda estão: Bárbara, Calliandra, Eveline, Letícia, Lorena, Luana, Luís, Marciano, Natasha e Thiago. Colegas que se tornaram amigos, que desde ceder um poço em um gel para eletroforese a contribuir com valiosas sugestões, se mostraram companheiros e membros de um grupo unido. Obrigada à Letícia, Lorena e Thiago também por terem colaborado no desenvolvimento deste projeto.

À Dona Ivanilde, Dona Fátima e ao Thompson, pela responsabilidade e presteza que tornam a rotina do laboratório eficiente.

À Ana, por ser atenciosa e pela competência no Departamento de Biologia Celular.

Ao grupo de virologia em que participei dos projetos de iniciação científica, pelo aprendizado e amizade. Obrigada à professora Cláudia Renata (*in memoriam*), Claudiner, Daniela, Eduardo, Margareti, Natália, Nazle, Patrícia, Regina, Tainá e Verônica.

Aos meus amados pais, Tiana e Luiz, que me ensinaram lições para construir uma vida com dignidade e simplicidade, por serem minha referência e meu porto-seguro.

Ao meu marido, Diogo, que me incentivou e apoiou desde a escolha pelas Ciências Biológicas até a decisão de realizar este trabalho. Nos momentos mais difíceis, estive ao meu lado e me ensinou a ter perseverança.

Aos meus irmãos, familiares e amigos, que mesmo sem compreenderem este trabalho, se interessam e torcem por mim.

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora pelas bênçãos, por me fortalecerem e me iluminarem durante esta etapa, onde aprendi não só sobre ciência, mas também sobre superação de obstáculos. Obrigada por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que estão comigo nos momentos de dificuldade e também nos momentos de conquista.

SUMÁRIO

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XV
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e Paracoccidioidomicose	1
1.2 – Parede Celular de Fungos	4
1.2.1 – Parede Celular de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	4
1.2.2 – Parede Celular de Fungos e Virulência	5
1.3 – Genes de Parede Celular	8
1.3.1 – 1,3- β -glicana sintase	8
1.3.2 – Quitina sintase 4	10
1.4 – Estudo de Promotores e Abordagens Experimentais	14
1.4.1 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	15
1.4.2– Sistema de Gene Repórter <i>lacZ</i>	17
1.5 – Utilização de <i>Aspergillus nidulans</i> como Hospedeiro Heterólogo para Estudo da Regulação da Expressão Gênica	18
2 – OBJETIVOS	21
2.1 – Objetivo Geral	21
2.2– Objetivos Específicos	21

3 – MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 – Soluções e Soluções Tampão	22
3.1.1 – Soluções para Meios de Cultura de <i>A. nidulans</i>	22
3.1.2 – Soluções Tampão para Transformação de <i>A. nidulans</i>	23
3.1.3 – Soluções para Extração de DNA Total dos Transformantes de <i>A. nidulans</i>	25
3.1.4 – Soluções para Extração de Proteínas de <i>P. brasiliensis</i>	26
3.1.5 – Soluções para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante - SDS-PAGE	26
3.1.6 – Soluções para o Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	28
3.2 – Meios de Cultura	28
3.3 – Linhagens Microbiológicas	31
3.3.1 – <i>Escherichia coli</i>	31
3.3.2 – <i>Aspergillus nidulans</i>	31
3.3.3 – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	31
3.4 – Vetor Gene Repórter	32
3.5 – Sistema de Gene Repórter <i>lacZ</i> para Análise da Região Promotora do gene 1,3-β-glicana sintase de <i>P. brasiliensis</i>	33
3.5.1 – Preparação de Células de <i>E. coli</i> Termo-Competentes	33
3.5.2 – Transformação de <i>E. coli</i> com o Vetor Gene Repórter	33
3.5.3 – Preparação de Plasmídeos em Larga Escala	34
3.5.4 – Digestão do Vetor Gene Repórter	34
3.5.5 – Preparação de Protoplastos e Transformação de <i>A. nidulans</i> com o Vetor Gene Repórter	35
3.5.6 – Ensaio de Estabilidade Mitótica	36
3.5.7 – Extração de DNA Total dos Transformantes de <i>A. nidulans</i>	37
3.5.8 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Amplificação de um Fragmento do Promotor do Gene <i>Pbfks1</i> dos Transformantes de <i>A. nidulans</i>	37
3.5.9 – Ensaio em Placa da Atividade de β -galactosidase	38
3.6 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética para Análise da Região Promotora dos Genes 1,3-β-glicana sintase e quitina sintase 4 de <i>P. brasiliensis</i>	38
3.6.1 – Extração de Proteínas de <i>P. brasiliensis</i>	38
3.6.2 – Produção e Purificação do Domínio de Ligação ao DNA da Proteína PacC de <i>P. brasiliensis</i>	39
3.6.3 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante - SDS-PAGE	41
3.6.4 – Análise da Seqüência Promotora dos Genes <i>Pbfks1</i> e <i>Pbchs4</i> e Desenho das Sondas para EMSA	42
3.6.5 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	43

3.7 – Análise da Expressão do Gene 1,3-β-glicana sintase	47
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. – Análise da Região Promotora do Gene quitina sintase 4 de <i>P. brasiliensis</i>	51
4.1.1 – Produção da Proteína Recombinante PacCPb-GST para Análise do Promotor do Gene <i>Pbchs4</i>	53
4.1.2 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda <i>Pbchs4(a)</i>	54
4.1.3 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda <i>Pbchs4(b)</i>	64
4.2 – Análise da Região Promotora do Gene 1,3-β-glicana sintase de <i>P. brasiliensis</i>	67
4.2.1 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda <i>Pbfks1(a)</i>	68
4.2.2 – Análise da Expressão do Gene 1,3-β-glicana sintase de <i>P. brasiliensis</i>	72
4.2.3 – Sistema de Gene Repórter <i>lacZ</i> para Análise da Região Promotora do Gene 1,3-β-glicana sintase de <i>P. brasiliensis</i>	73
5 – CONCLUSÃO	78
6 – PERSPECTIVAS	79
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis, o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), é um fungo termodimórfico que cresce como micélio à temperatura ambiente e se diferencia para levedura em culturas a 37°C e no tecido do hospedeiro. A transição dimórfica de *P. brasiliensis* está associada com alterações na parede celular. Quando o fungo se diferencia de micélio para levedura, o conteúdo de quitina é aumentado e a composição de glicana é alterada, reduzindo o conteúdo de 1,3-β-glicana e aumentando o conteúdo de 1,3-α-glicana. Em *P. brasiliensis*, um homólogo do gene de 1,3-β-glicana sintase (*Pbfks1*) e seis genes de quitina sintase (*Pbchs1*, *Pbchs2*, *Pbchs3*, *Pbchs4*, *Pbchs5* e *Pbchs6*) foram identificados. Em nosso estudo, nós investigamos a região promotora dos genes *Pbfks1* e *Pbchs4*. Por meio de ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA), analisamos sondas referentes aos promotores desses dois genes e identificamos prováveis sítios regulatórios. A análise da região promotora do gene *Pbfks1* indica um TATA Box que pode ser funcional, e sugerimos que o promotor do gene *Pbchs4* possa estar sendo regulado pelo elemento de resposta ao estresse (STRE). Além disso, demonstramos também que o domínio de ligação ao DNA de PacC de *P. brasiliensis* reconhece um sítio descrito para PacC de *A. nidulans*, porém, a proteína não reconheceu uma variação na seqüência consenso presente no promotor do gene *Pbchs4*. Observamos que uma sonda referente ao promotor do gene *Pbchs4* que contém um sítio para o fator de transcrição CreA não interage com o domínio de ligação ao DNA de CreA de *Humicola grisea*, mas apresenta interações DNA-proteína específicas nas fases de micélio e levedura. Adicionalmente, resultados de RT-PCR em tempo real revelaram que o gene *Pbfks1* é mais expresso em meio com acetato do que em meio com glicose como fonte de carbono. Portanto, o trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa fornece dados que podem contribuir para a compreensão da regulação dos promotores dos genes 1,3-β-glicana sintase e quitina sintase 4 em *P. brasiliensis*.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis, the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), is a thermal dimorphic fungus which grows as a mycelium at room temperature and differentiates to yeast in cultures at 37°C and in the host tissue. The dimorphic transition of *P. brasiliensis* is associated with changes in the cell wall. When the fungus differentiates from mycelium to yeast, the chitin content is increased and the composition of glucan changes, reducing the 1,3- β -glucan content and enhancing the content of 1,3- α -glucan. In *P. Brasiliensis*, one homologous of 1,3- β -glucan synthase gene (*Pbfks1*) and six genes of chitin synthase (*Pbchs1*, *Pbchs2*, *Pbchs3*, *Pbchs4*, *Pbchs5* e *Pbchs6*) were identified. In our study, we investigated the promoter region of *Pbfks1* and *Pbchs4* genes. By means of Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA), we analyzed probes referring to promoters of these two genes and we identified probable regulatory sites. The analysis of the promoter region of the *Pbfks1* gene indicates one TATA Box that could be functional, and we propose that the *Pbchs4* promoter may be regulated by the stress responsive elements (STRE). Furthermore, we also demonstrated that the PacC DNA binding-domain of *P. brasiliensis* recognizes one *A. nidulans*'s PacC described site, nevertheless, the protein didn't recognize one variation in the consensus sequence in the *Pbchs4* promoter. We observed one *Pbchs4* promoter probe with one CreA transcription factor site doesn't interact with the CreA DNA bind-domain of *Humicola grisea*, but shows specific DNA-protein interactions in mycelium and yeast phases. Additionally, results of Real Time RT-PCR disclosed that *Pbfks1* gene is more expressed in medium with acetate then in medium with glucose as a carbon source. Therefore, the work developed in our research group provides data which may contribute for the comprehension of 1,3- β -glucan synthase and chitin synthase 4 promoters' regulation in *P. brasiliensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Produção de 1,3-β-glicana e quitina na parede celular.	6
Figura 2.	Filograma de quitina sintases de fungos.	12
Figura 3.	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética de uma seqüência da região promotora do gene <i>Pbchs4</i> com extratos protéicos de micélio e levedura de <i>P. brasiliensis</i> .	13
Figura 4.	Esquema ilustrativo do Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética.	17
Figura 5.	Esquema ilustrativo do sistema de gene repórter <i>lacZ</i> .	18
Figura 6.	Agrupamento das espécies de fungos, de acordo com a proposta do <i>Fungal Genome Initiative</i> (FGI).	20
Figura 7.	Esquema dos vetores da série pAN923.	32
Figura 8.	Conformação <i>head-to-head</i> dos genes <i>Pbchs4</i> e <i>Pbchs5</i> .	51
Figura 9.	Seqüência nucleotídica da região intergênica dos genes <i>Pbchs4</i> e <i>Pbchs5</i> (número de acesso no GenBank EF654132).	52
Figura 10.	Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12%) da proteína recombinante PacCPb-GST, corado com <i>Comassie Blue</i> .	54
Figura 11.	Sonda <i>Pbchs4(a)</i> .	54
Figura 12.	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando a sonda <i>Pbchs4(a)</i> com a proteína recombinante PacCPb-GST.	55
Figura 13.	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética para teste da funcionalidade da proteína recombinante PacCPb-GST.	56
Figura 14.	Comparação dos sítios de ligação para PacC presentes nas sondas 1, 3 e 4 de <i>H. grisea</i> e na sonda <i>Pbchs4(a)</i> .	58
Figura 15.	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando as sondas <i>Pbchs4(a)</i> mutadas e extrato protéico de micélio de <i>P. brasiliensis</i> .	60
Figura 16.	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando as sondas <i>Pbchs4(a)</i> mutadas e extrato protéico de levedura de <i>P. brasiliensis</i> .	62

Figura 17.	Sonda <i>Pbchs4(b)</i>.	64
Figura 18.	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando a sonda <i>Pbchs4(b)</i> e com extratos protéicos de micélio ou levedura de <i>P. brasiliensis</i>, ou a proteína recombinante CreAHg-GST.	65
Figura 19.	Seqüência nucleotídica da região promotora do gene <i>Pbfks1</i> (número de acesso no GenBank AF148715).	67
Figura 20.	Sonda <i>Pbfks1(a)</i>.	68
Figura 21.	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando as sondas <i>Pbfks1(a)</i> mutadas e extrato protéico de micélio ou levedura de <i>P. brasiliensis</i>.	70
Figura 22.	Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) da digestão do vetor gene repórter (vetor 42B da série pAN923) contendo a região promotora do gene <i>Pbfks1</i>.	74
Figura 23.	Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) da amplificação de um fragmento do promotor do gene <i>Pbfks1</i> a partir do DNA dos fungos transformantes.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos principais componentes da parede celular de <i>P. brasiliensis</i> .	4
Tabela 2.	Sítios analisados na região promotora dos genes <i>Pbfks1</i> e <i>Pbchs4</i> .	15
Tabela 3.	Oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação de um fragmento do promotor do gene <i>Pbfks1</i> dos transformantes de <i>A. nidulans</i> .	37
Tabela 4.	Sondas utilizadas em EMSA.	43
Tabela 5.	Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR em Tempo Real.	50
Tabela 6.	Análise da diferença entre os níveis de transcrito do gene <i>Pbfks1</i> em micélio e em levedura de <i>P. brasiliensis</i> .	72
Tabela 7.	Análise da diferença entre os níveis de transcrito do gene <i>Pbfks1</i> em glicose e em acetato de sódio.	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	aminoácido
cDNA	DNA complementar
<i>CHS</i>	gene que codifica a quitina sintase em fungos; ocorrem variações dessa nomenclatura e número de genes identificados, de acordo com os autores citados ao longo deste trabalho
CreAHg-GST	domínio de ligação ao DNA da proteína CreA de <i>H. grisea</i> fusionado à GST
DEAE	dietilaminoetil
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeo
DTT	ditiotretitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EMSA	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (e outros)
FAM	fluoróforo carboxifluoresceína
FGI	<i>Fungal Genome Initiative</i>
<i>FKS</i>	gene que codifica a 1,3- β -glicana sintase em fungos; ocorrem variações dessa nomenclatura e número de genes identificados, de acordo com os autores citados ao longo deste trabalho
g	grama
<i>g</i>	unidade de medida da força centrífuga
GlcNac	N-acetilglicosamina
GST	glutathione S-transferase
h	hora
HEPES	N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i>
HSE	Elemento de Resposta ao Choque Térmico
HSP	proteína de choque térmico
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobase

KDa	quilodalton
<i>lacZ</i>	gene de <i>E. coli</i> que codifica a enzima β -galactosidase
LB	Luria-Bertani (meio de cultura LB)
M	Molar
mA	miliamper
MAP quinase	proteína quinase ativada por mitógeno
Mb	megabase
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
min	minuto
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
OD	densidade óptica
ONPG	o-nitrofenil- β -D- galactopiranosídeo
ORF	região aberta de leitura
PABA	ácido paraminobenzóico
PacCPb-GST	domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de <i>P. brasiliensis</i> fusionado à GST
pb	pares de base
<i>Pbchs</i>	gene que codifica a quitina sintase de <i>P. brasiliensis</i> ; foram identificados seis genes que codificam quitina sintases em <i>P. brasiliensis</i> (<i>Pbchs1</i> , <i>Pbchs2</i> , <i>Pbchs3</i> , <i>Pbchs4</i> , <i>Pbchs5</i> e <i>Pbchs6</i>)
<i>Pbfks1</i>	gene que codifica a 1,3- β -glicana sintase identificado em <i>P. brasiliensis</i>
PCM	paracoccidiodomicose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PKC	proteína quinase C
PMSF	fluoreto fenil metil sulfonil
poli(dI-dC)	polímero sintético de deoxiinosina e deoxicitidina (utilizado como competidor inespecífico em EMSA)

p/v	massa/volume
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	amplificação por PCR de um produto de transcrição reversa (cDNA)
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (condições desnaturantes)
seg	segundo
STRE	Elemento de Resposta ao Estresse
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TE	tampão Tris-EDTA
TEB	tampão Tris-EDTA-borato
TEMED	N,N,N', N'-tetrametil etilenodimetilamina
TESS	<i>Transcription Element Search System</i>
T _m	<i>Melting Temperature</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRIS	tris-(hidroximetil)-aminometano
V	Volts
v/v	volume/volume
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
YPD	Yeast Peptone Dextrose (meio YPD)
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
1X	concentração para uso
25X	vinte e cinco vezes concentrado
50X	cinquenta vezes concentrado
100X	cem vezes concentrado

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – *Paracoccidioides brasiliensis* e Paracoccidioidomicose

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose humana endêmica na América Latina. A PCM afeta principalmente a população de áreas rurais e ocorre predominantemente no Brasil, Colômbia e Venezuela (Franco *et al.*, 1993). No Brasil, onde as maiores taxas de incidência ocorrem nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, a PCM destacou-se como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias, e apresentou a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (Coutinho *et al.*, 2002). Estima-se que entre dois a três indivíduos a cada 100 mil habitantes adoeçam de PCM na América Latina anualmente. No Brasil, espera-se que de quatro a seis mil novos casos ocorram a cada ano (revisto por Telles, 2008).

A PCM apresenta uma multiplicidade de manifestações clínicas, ocorrendo desde a forma cutânea às formas sistêmicas, atacando diversos tecidos. Primeiramente os pulmões são comprometidos, e a micose pode se disseminar para outros órgãos e sistemas. Lesões secundárias aparecem freqüentemente em mucosas, linfonodos, adrenais e pele (Brummer *et al.*, 1993). O diagnóstico da PCM pode ser realizado por microscopia para identificação do *P. brasiliensis* ou por testes sorológicos, usualmente para detecção da glicoprotéina gp43 (Fornajeiro *et al.*, 2005), mas ferramentas moleculares para amplificação de fragmentos genômicos gerados por uma ampla variedade de isolados de *P. brasiliensis* também podem ser incorporadas ao diagnóstico (San-Blas *et al.*, 2005). Tanto a apresentação clínica da micose como o curso da doença variam de paciente para paciente. Dessa forma, a PCM pode assumir a forma crônica ou aguda, e o tratamento é usualmente prolongado. As drogas eficazes contra a paracoccidioidomicose compreendem três grupos: anfotericina B, compostos sulfanilamídicos e o grupo de drogas azólicas (revisto por Palmeiro *et al.*, 2005). Na ausência dos medicamentos a doença pode ser fatal.

A PCM foi descrita por Adolfo Lutz no Brasil em 1908 e, em 1930, Floriano Paulo de Almeida identificou e designou seu agente etiológico, o *P. brasiliensis*. Análises filogenéticas, baseadas em rDNA 28S, permitiram a classificação de *P. brasiliensis* na família Onygenaceae, pertencente à ordem Onygenales (filo Ascomycota). Embora seja classificado como um ascomiceto, a fase sexual de *P. brasiliensis* não foi demonstrada morfológicamente (Bagagli *et al.*, 2008). Observa-se uma extensa variabilidade genética entre os isolados de *P. brasiliensis*. Matute *et al.* (2006) sugerem que existam pelo menos três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*, das quais duas são espécies monofiléticas (PS2, composta por isolados da Venezuela e Brasil, e PS3, composta por isolados da Colômbia), e uma espécie parafilética (S1, com ampla abrangência nas áreas endêmicas). O Pb01, objeto de estudo deste trabalho, é um isolado clínico que diverge dessas três espécies filogenéticas descritas. A análise filogenética de isolados que se assemelham ao genótipo de Pb01, isolados denominados “Pb01-like”, permitiu agrupar esses isolados em um grupo filogenético distinto dos grupos S1, PS2 e PS3, e sugere-se a descrição formal de uma nova espécie para esse grupo, denominada *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira, 2009). Recentemente, o genoma do isolado Pb01, de aproximadamente 32 Mb, foi seqüenciado pelo *Broad Institute* (www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), estimando-se cerca de 9 mil genes.

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico. Essa classificação é baseada na habilidade de transição entre duas morfologias distintas, associadas a uma condição ambiental específica. Os fungos dimórficos de importância médica são *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *P. brasiliensis*, *Penicillium marneffei* e *Sporothrix schenckii* (revisito por Chaffin *et al.*, 1998 e Rappleye e Goldman, 2006). O fungo *P. brasiliensis* cresce na forma de levedura em culturas a 37°C e no tecido do hospedeiro, e na temperatura ambiente ocorre na forma micelial. Sugere-se que o habitat de *P. brasiliensis* seja o solo, onde o fungo existe como saprófita. A infecção é adquirida pela via respiratória por meio da inalação de estruturas da forma micelial, que sofrem transição para a forma de levedura no tecido do hospedeiro (Brummer *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2007).

A PCM é mais freqüente em homens expostos ao habitat do fungo pelo trabalho agrícola. Em mulheres, a infecção é rara em função do papel protetor do hormônio estrogênio

(revisado por Palmeiro *et al.*, 2005). O estrógeno inibe a transição de micélio para levedura *in vitro*, e estudos *in vivo* corroboram os dados epidemiológicos e *in vitro* ao observar que os hormônios femininos bloqueiam a transição dimórfica, promovendo resistência à doença (Aristizabal *et al.*, 1998). Em *P. brasiliensis*, a transição dimórfica é essencial para o estabelecimento da doença visto que linhagens incapazes de se diferenciarem em levedura são avirulentas (Franco *et al.*, 1993). Observa-se que a transformação para a fase de levedura é um fator chave para o processo invasivo no hospedeiro, razão pela qual é fundamental o conhecimento dos eventos metabólicos e mecanismos regulatórios envolvidos na transição dimórfica.

A transição dimórfica em *P. brasiliensis* é governada predominantemente pela temperatura e é precedida por alterações moleculares. A identificação de genes diferencialmente expressos e/ou genes requeridos para o dimorfismo é importante para a compreensão dos eventos que ocorrem no estabelecimento da infecção e doença. A análise do transcriptoma de *P. brasiliensis* realizada por Felipe *et al.* (2005), cobrindo aproximadamente 80% do genoma, revelou diferenças na expressão gênica nas fases de micélio e levedura, com um padrão de expressão diferencial de genes associados ao metabolismo, ciclo celular, síntese da parede celular e vias de transdução de sinal, tendo sido identificados novos genes que podem estar associados à virulência. A transição dimórfica de *P. brasiliensis* está correlacionada com alterações na composição, organização e estrutura da parede celular. Observa-se que quando o fungo se diferencia de micélio para levedura ocorre um aumento no conteúdo de quitina e alteração na composição de glicana, de modo que diminui o conteúdo de 1,3- β -glicana e aumenta o de 1,3- α -glicana (Kanetsuna *et al.*, 1972). Portanto, estudos sobre a regulação da expressão dos genes associados à síntese da parede celular podem contribuir para a compreensão dos eventos que ocorrem na transição dimórfica e na patogênese do fungo.

1.2 – Parede Celular de Fungos

1.2.1 – Parede Celular de *Paracoccidioides brasiliensis*

A parede celular de *P. brasiliensis* apresenta um papel essencial na patobiologia do fungo, pois está diretamente relacionada a mudanças morfogênicas durante a transição dimórfica. Uma estratégia direcionada para a compreensão da morfogênese do fungo é o estudo dos seus componentes estruturais. A distribuição dos principais componentes da parede celular de *P. brasiliensis* está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos principais componentes da parede celular de *P. brasiliensis* – Observam-se diferenças significativas dos componentes entre as formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis*.

Componentes da Parede Celular	Micélio	Levedura
Proteínas	24 – 41%	7 -14%
Lipídeos	5 – 10%	5 – 10%
Quitina	7 – 18%	37 – 48%
Glicana	36 – 47%	36 – 47%
	(predomina 1,3- β -glicana)	(predomina 1,3- α -glicana)

Dados retirados de Kanetsuna *et al.*, 1969; Kanetsuna *et al.*, 1972.

A forma de levedura apresenta um conteúdo maior de quitina do que a forma micelial, enquanto que a forma micelial apresenta um maior conteúdo de proteínas do que a forma de levedura. Não há diferenças significativas na quantidade de lipídios e glicanas entre as duas formas. Observa-se que a composição da parede celular de *B. dermatitidis* é similar à composição da parede celular de *P. brasiliensis* (Kanetsuna *et al.*, 1969). Em *C. albicans*, a 1,3- β -glicana constitui de 47 a 60% do peso da parede celular, e a quitina de 0,6 a 9,0% (Chaffin *et al.*, 1998). Em *P. brasiliensis*, a 1,3- α -glicana predomina na forma de levedura, enquanto que na fase de micélio predomina a 1,3- β -glicana. A síntese de 1,3- α -glicana em uma cultura decresce rapidamente após a mudança de temperatura de 37°C para 20°C, e a síntese de 1,3- β -glicana é aumentada (Kanetsuna *et al.*, 1972). Em *B. dermatitidis*, a 1,3- α -glicana também é prevalente na levedura, enquanto que a 1,3- β -glicana é prevalente no micélio (Kanetsuna e Carbonell, 1971). Em *P. brasiliensis*, outro polissacarídeo de glicose

encontrado na forma micelial é a galactomanana (Kanetsuna *et al.*, 1972), responsável pelas propriedades antigênicas da parede celular.

San Blas e San Blas (1982) realizaram preparações de micélio e levedura de *P. brasiliensis* que foram submetidas a tratamentos com diversos detergentes na tentativa de solubilizar a glicana sintase da membrana, obtendo-se maior sucesso nas preparações de levedura do que nas preparações de micélio, corroborando as observações de que as estruturas de ambas as formas são diferentes.

1.2.2 – Parede Celular de Fungos e Virulência

Antes vista como uma estrutura rígida, inerte e dedicada à proteção celular, a parede celular de fungos é agora vista como uma estrutura dinâmica e amplamente interativa. A mobilidade dos componentes da parede celular e sua resposta às condições externas são reconhecidas como propriedades dessa complexa estrutura. Além disso, vários componentes têm sido caracterizados na parede celular, como glicosfingolipídeos, proteínas de choque térmico, fosfatases, histonas e antígenos transientes (Nimrichter *et al.*, 2005).

A parede celular de fungos é uma estrutura sujeita a mudanças, e sua composição e organização estrutural são reguladas durante o ciclo celular, em resposta a alterações ambientais e ao estresse. A quitina e 1,3- β -glicana representam os principais componentes da parede celular de fungos. Esses polissacarídeos contrapõem a pressão de turgor dentro da célula e determinam sua morfologia (revisto por San-Blas e Nino-Vega, 2008). A figura 1 apresenta um esquema da formação da parede de celular com seus polímeros principais, quitina e 1,3- β -glicana, que se apresentam interconectados nessa estrutura celular.

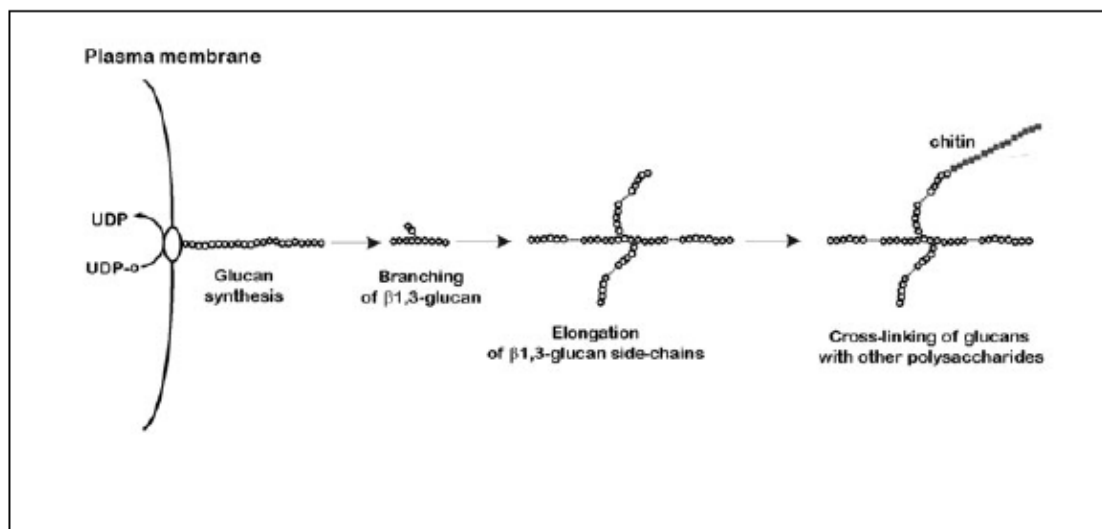


Figura 1. Produção de 1,3-β-glicana e quitina na parede celular – Os polímeros de 1,3-β-glicana e de quitina são interconectados. Retirado de Latgé, 2007.

A parede celular de fungos apresenta função tanto de proteção como de agressão. Em sua ação de proteção atua como uma barreira inicial que está em contato com o ambiente hostil encontrado pelos fungos. Se removida ou comprometida, o fungo não sobrevive, a menos que esteja osmoticamente protegido. A ação agressiva deve-se ao fato de que a parede celular pode apresentar moléculas hidrolíticas e tóxicas, que podem ser requeridas para a invasão em determinados ambientes. Além disso, sua estrutura rígida é proveitosa para a penetração em substratos que são colonizados ou invadidos (Latgé, 2007).

Na parede celular de fungos pode ocorrer deposição de melanina. A habilidade de fungos patogênicos em produzir melanina é associada à virulência, e já foi detectada em *P. brasiliensis*, *S. schenckii*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. posadasii*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. A melanização parece contribuir para a virulência reduzindo a susceptibilidade aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às drogas antifúngicas (Taborda *et al.*, 2008). Em ensaios com macrófagos de murinos, Silva *et al.* (2006) observaram que leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* foram fracamente fagocitadas, mesmo na presença do sistema complemento. Além desse fator associado à virulência, um importante antígeno transiente expresso na parede celular de *P. brasiliensis* é a glicoproteína gp43, que é sintetizada e transportada para a parede celular, onde permanece por um certo tempo e é posteriormente secretada no meio (revisado por Nimrichter *et al.*, 2005). A glicoproteína gp43 é um receptor para laminina e está envolvida nos mecanismos de adesão durante a infecção (Hanna *et al.*, 2002). Popi *et al.* (2002) demonstraram ainda que gp43 inibe

a atividade fungicida de macrófagos e sugerem seu papel no mecanismo de evasão no estabelecimento da infecção primária em hospedeiros susceptíveis.

O reino fungi é incrivelmente diverso e seus membros podem habitar uma ampla variedade de nichos. Entretanto, poucas espécies são patogênicas para os humanos. Transições morfogênicas são frequentemente requeridas para expressão de virulência (revisto por San Blas e Nino-Vega, 2008). O dimorfismo, crescimento em temperaturas elevadas, aderência a células do hospedeiro, componentes da parede celular, proteinases, lipases, fosfolipases e outros são considerados potenciais fatores de virulência importantes no processo invasivo (revisto por Tavares *et al.*, 2005). O mercado mundial para agentes antifúngicos foi estimado em 11,9 bilhões de dólares em 2007 (West, 2007). Entretanto, as drogas atuais são reconhecidas por sua inabilidade em atuar rapidamente, toxicidade e espectro limitado. Há uma necessidade crítica para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Além disso, existe uma incidência crescente de resistência aos antifúngicos disponíveis, como o fluconazol (Birren *et al.*, 2003). Devido ao fato de que a parede celular atua na proteção do fungo e, além disso, muitos de seus componentes não são presentes em humanos, a parede celular é um alvo atrativo para drogas.

Nessa perspectiva, estudos sobre a parede celular, assim como sobre as enzimas envolvidas na biossíntese da parede, fornecem informações valiosas para o desenvolvimento de drogas antifúngicas. As glicanas presentes na parede celular desempenham um importante papel na virulência em *P. brasiliensis*. Klimpel e Goldman (1988) relataram que em *H. capsulatum* linhagens avirulentas apresentaram um conteúdo de 1,3- α -glicana cerca de mil vezes menor do que nas linhagens virulentas. Também foi demonstrado que linhagens avirulentas de *P. brasiliensis* induzem uma resposta do sistema de defesa do hospedeiro maior do que as linhagens virulentas, e que a 1,3- β -glicana induz a atração de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos durante a resposta inflamatória mediante a indução do fator de necrose tumoral (TNF) (Silva *et al.*, 1994). Essas observações indicam que a alteração de 1,3- β -glicana para 1,3- α -glicana na transição dimórfica de micélio para levedura proteja o fungo contra o sistema de defesa do hospedeiro. Além da observação da alteração no conteúdo de glicana, o aumento acentuado do conteúdo de quitina na levedura de *P. brasiliensis* também requer atenção, e reconhece-se que genes envolvidos na biossíntese da parede podem apresentar função na transição dimórfica.

1.3 – Genes de Parede Celular

1.3.1 – 1,3- β -glicana sintase

A 1,3- β -glicana é o principal polímero da parede celular de fungos, e é sintetizada a partir de UDP-glicose pela enzima 1,3- β -glicana sintase. A atividade catalítica de 1,3- β -glicana sintase é regulada por uma GTPase da superfamília Ras, a Rho1-GTPase, e pela proteína quinase C (PKC). Rho1-GTPase é uma subunidade regulatória de 1,3- β -glicana sintase, que estimula a sua atividade. Essa subunidade também regula a integridade da parede celular por meio de uma via de sinalização, ligando-se e ativando PKC (revisto por Zhao *et al.*, 1998).

Em *S. cerevisiae*, a síntese de 1,3- β -glicana ocorre na membrana plasmática por meio da atividade dos produtos de dois genes homólogos, *FKS1* e *FKS2*. A seqüência nucleotídica de *FKS1* codifica uma proteína integral de membrana (Fks1p) de 215 kDa. A seqüência nucleotídica de *FKS2* também codifica uma proteína integral de membrana (Fks2p) de 217 kDa, que apresenta 88% de identidade com Fks1p. A análise da expressão do gene *FKS1* de *S. cerevisiae* revelou que sua transcrição é regulada durante o ciclo celular, predominando durante o crescimento em glicose, e sendo reduzida quando a glicose é substituída por acetato de sódio. Já a expressão do gene *FKS2* é reprimida por glicose e induzida por Ca^{2+} e feromônios, sendo essencial para a esporulação, que ocorre em fontes pobres de carbono, como o acetato de sódio (Douglas *et al.*, 1994; Mazur *et al.*, 1995). Zhao *et al.* (1998) demonstraram que a expressão do gene *FKS2* também é induzida em temperaturas elevadas, e que a indução em fontes pobres de carbono é uma resposta à repressão por glicose, sob o controle do repressor transcricional Mig1p.

Em *C. albicans*, o gene *GSCI* foi descrito por Mio *et al.* (1997) como responsável por codificar uma unidade catalítica da 1,3- β -glicana sintase, codificando uma proteína predita de 210 kDa (Gsc1p), com cerca de 72% de identidade com as proteínas homólogas em *S. cerevisiae*. Além de *GSCI*, *C. albicans* apresenta outro gene que pode estar relacionado à 1,3- β -glicana sintase, denominado *GSL1*. Apesar de ter uma ORF correspondente a apenas 57% da ORF de *GSCI*, a proteína predita (Gsl1) apresenta 54% de identidade com Gsc1p. Tanto

GSCI como *GSLI* são expressos na fase de levedura de *C. albicans*, e quando o crescimento da hifa foi induzido, os níveis de mRNA declinaram. Em *Neurospora crassa*, foi identificada uma proteína descrita como subunidade de 1,3- β -glicana sintase (Shimoler *et al.*, 2003). Em *Aspergillus nidulans* e em *Schizosaccharomyces pombe*, um único homólogo do gene 1,3- β -glicana sintase foi descrito, denominados *fksA* (Kelly *et al.*, 1996) e *cps1* (Inshiguro *et al.*, 1997), respectivamente. Em *A. nidulans*, o gene *fksA* codifica uma proteína predita (FksAp) de 229 kDa, que apresenta elevado grau de conservação em tamanho e identidade com as proteínas homólogas em *S. cerevisiae* (Kelly *et al.*, 1996). Em *S. pombe*, o gene *cps1* codifica uma proteína predita que apresenta 55% de identidade com as homólogas em *S. cerevisiae*. Mutações no gene que codifica essa proteína provocaram hipersensibilidade a drogas descritas como inibidores da síntese de 1,3- β -glicana e também à temperatura (Inshiguro *et al.*, 1997). Kellner *et al.* (2004) caracterizaram um homólogo do gene 1,3- β -glicana sintase em *C. posadasii* (*FKS1*), cuja proteína predita apresenta alto grau de conservação com as 1,3- β -glicana sintases de fungos filamentosos. O gene *FKS1* de *C. posadasii* é expresso em níveis similares em micélio e em culturas no início da formação das esférulas, e decresce quando as esférulas estão maduras. Em *Cryptococcus neoformans*, o gene *FKS1* apresenta similaridade com os homólogos de outros fungos e parece ser a única cópia nesse organismo, sendo essencial para a viabilidade (Thompson *et al.*, 1999). Em *Yarrowia lipolytica*, o gene 1,3- β -glicana sintase (*YIFKS1*) codifica uma proteína de 1.961 aa, que apresenta uma alta homologia com as 1,3- β -glicana sintases em *C. albicans*, *S. pombe*, *A. nidulans*, *C. neoformans* e *P. brasiliensis*. A análise de expressão do gene *YIFKS1* em diferentes condições afetando a parede celular não revelou diferenças significativas, mas foi demonstrado que *YIFKS1* é essencial para o crescimento, sugerindo que este é também o único homólogo em *Y. lipolytica* (León *et al.*, 2002). Em *Fusarium solani*, foi clonado e seqüenciado o gene *FsFKS1*, que codifica uma proteína predita de 220 kDa, também com alto grau de similaridade (75 - 88%) às proteínas homólogas em *Neurospora crassa*, *P. brasiliensis*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* (Há *et al.*, 2006).

Em *P. brasiliensis*, Pereira *et al.* (2000) caracterizaram um homólogo do gene 1,3- β -glicana sintase. O gene *Pbfks1* (número de acesso no GenBank AF148715) apresenta uma ORF de 5.942 pb, interrompida por dois íntrons, o primeiro próximo à extremidade 5' e o segundo próximo à extremidade 3' do gene. Em seus experimentos para analisar a estrutura de genes de 1,3- β -glicana sintase de diferentes isolados de *P. brasiliensis*, Okamoto *et al.* (2006)

detectaram a expressão do gene *Pbfks1* a partir da extração de RNA de culturas de levedura e observaram que sete dos oito isolados analisados apresentam estruturas gênicas semelhantes a respeito da posição dos introns, que geralmente é conservada em genes homólogos. De acordo com Pereira *et al.* (2000), a seqüência deduzida de 1.926 aa constitui uma proteína predita de 212 kDa, que apresentou mais de 85% de similaridade à proteína FksAp de *A. nidulans*, e 71% de similaridade às proteínas Fks1p e Fks2p de *S. cerevisiae*. Análises computacionais de 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis* sugerem uma estrutura similar a uma proteína integral de membrana, apresentando cerca de 16 hélices transmembrana, conforme as 1,3- β -glicana sintases descritas. O putativo domínio catalítico predito é localizado no citoplasma e é hidrofóbico, limitado por dois domínios compostos por seis e dez hélices hidrofóbicas. Apesar de ter sido caracterizado um gene, outros dois fragmentos foram identificados e podem estar relacionados a 1,3- β -glicana sintase. Experimentos de RT-PCR sugerem que transcritos de *Pbfks1* não são detectados em células crescidas em glicose, comportamento semelhante ao que Mazur *et al.* (1995) relataram para *FKS2* de *S. cerevisiae* (Pereira *et al.*, 2000).

Uma classe de antifúngicos que inibem a síntese de 1,3- β -glicana sintase é formada por lipopeptídeos conhecidos como equinocandinas e pnemocandinas (Onishi *et al.*, 1999), e vários organismos têm sido descritos como susceptíveis a essas drogas (Douglas *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1996). Arendrup *et al.* (2008) relataram que isolados de *A. fumigatus* que apresentaram redução da suscetibilidade à caspofungina, droga pertencente à classe de equinocandina, expressaram altos níveis de 1,3- β -glicana sintase em relação aos isolados susceptíveis. Visto que a síntese de 1,3- β -glicana é importante para a estrutura da parede celular, um maior conhecimento da regulação de 1,3- β -glicana sintase em *P. brasiliensis* será de fundamental importância e poderá fornecer informações sobre a biologia desse fungo patogênico.

1.3.2 – Quitina sintase 4

A quitina sintase é uma proteína transmembrana que cataliza a polimerização de N-acetilglicosamina (GlcNAc), a partir de UDP-GlcNAc do citoplasma, em cadeias de polissacarídeo, constituindo a quitina da parede celular. A síntese de quitina em fungos é um processo complexo regulado por uma família multigênica. Baseado em diferenças em regiões

conservadas, as quitina sintases foram organizadas em sete classes, dentro de duas divisões. Em *P. brasiliensis*, foram identificados seis genes de quitina sintase: *Pbchs1* (classe I), *Pbchs2* (classe II), *Pbchs3* (classe IV), *Pbchs4* (classe VII), *Pbchs5* (classe V) e *Pbchs6* (classe VI) (revisto por San-Blas e Nino-Vega, 2008).

Em *C. albicans* a quitina é sintetizada por quatro quitina sintases, codificadas pelos genes *CaCHS1* (classe II), *CaCHS2* e *CaCHS8* (classe I), e *CaCHS3* (classe IV). *S.cerevisiae* apresenta três genes de quitina sintases, *CHS1* (classe I), *CHS2* (classe II) e *CHS3* (Class IV) (revisto por Munro *et al.*, 2007).

Nino-Vega *et al.* (2004) caracterizaram o gene quitina sintase 4 de *P. brasiliensis* (número de acesso no GenBank EF654132), que apresenta uma ORF de 5.322 pb, interrompida por três íntrons. A análise da seqüência deduzida de 1.744 aa revelou a presença de dois domínios distintos, sendo um domínio N-terminal com 30% de homologia com o domínio *myosin motor-like*, e um domínio C-terminal com 68% de homologia com o domínio quitina descrito para algumas quitina sintases da classe V. Entretanto, diferente das quitina sintases de classe V, *Pbchs4* não apresenta assinaturas características do domínio *myosin motor-like*. Além disso, apesar do domínio quitina apresentar homologia com outras quitinas de classe V, foi considerado que a quitina sintase 4 de *P. brasiliensis* pertence a uma outra classe, denominada classe VII. A figura 2 mostra um filograma elaborado com quitina sintases de fungos, indicando o posicionamento de *Pbchs4* na classe VII.



Figura 2. Filograma de quitina sintases de fungos – As seqüências foram alinhadas usando CLUSTAL W. Apenas o domínio C-terminal da quitina sintase foi utilizado para enzimas das classes V e VII. Duas divisões e sete classes são apresentadas. Quitina sintases representativas de todas as classes são mostradas. As seqüências foram obtidas no Gen-Bank. Ca, *Candida albicans*; Wd, *Wangiella dermatitidis*; An, *Aspergillus nidulans*; Ao, *Aspergillus oryzae*; Bg, *Blumeria graminis*; Gg, *Glomerella graminicola*; Um, *Ustilago maydis*; Pb, *Phycomyces blakesleeanus*; Ci, *Coccidioides immitis*; Pbr, *Paracoccidioides brasiliensis*; Nc, *Neurospora crassa*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Af, *Aspergillus fumigatus*; Mg, *Magnaporthe grisea*. Modificado de Nino-Vega *et al.*, 2004.

Em *P. brasiliensis*, apesar do maior conteúdo de quitina ser encontrado na forma de levedura, os níveis de mRNA de *Pbchs4* são maiores na forma de micélio. Nino-Vega *et al.* (2000) analisaram a expressão dos genes *Pbchs1*, *Pbchs2*, *Pbchs3*, *Pbchs4* e *Pbchs5*, e verificaram que todos, exceto *Pbchs3*, são mais expressos na forma de micélio. O gene *Pbchs3* não foi expresso em níveis detectáveis.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, Sant'Ana (2008) demonstrou que uma seqüência da região promotora de *Pbchs4* que contém um sítio para o fator de transcrição

PacC, que regula a expressão gênica em resposta ao pH, e dois elementos de resposta ao estresse (STRE), interage com extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Foi observada uma interação DNA-proteína específica nas fases de micélio e levedura e outra interação micélio específica, conforme mostra a figura 3.

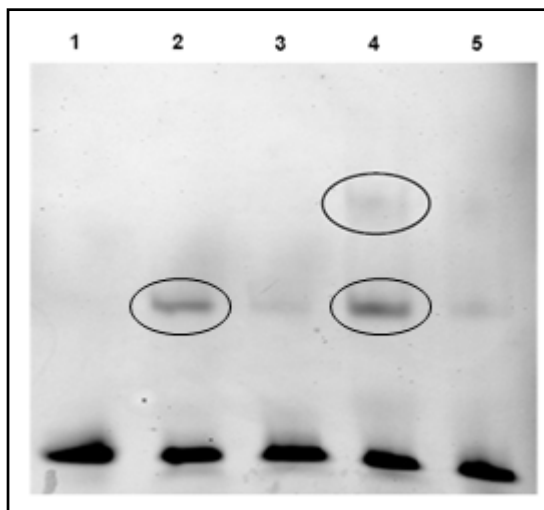


Figura 3. Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética de uma seqüência da região promotora do gene *Pbchs4* com extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis* – 1: sonda livre; 2: sonda + extrato protéico da forma de levedura, indicando uma interação; 3: sonda + extrato protéico da forma de levedura + competidor específico 50X; 4: sonda + extrato protéico da forma de micélio, indicando uma interação similar à observada para a fase de levedura e outra interação micélio específica; 5: sonda + extrato protéico da forma de micélio + competidor específico 50X. Modificado de Sant’Ana (2008).

Esses resultados sugerem que essa região possa estar atuando na regulação transcricional do gene quitina sintase 4 de *P. brasiliensis*, mas não determinaram se a interação ocorre no sítio para PacC ou nos elementos de resposta ao estresse.

Em *S. cerevisiae*, apesar da quitina corresponder a uma pequena fração da parede celular, o comprometimento na regulação da síntese desse componente pode afetar profundamente o padrão de crescimento e morfologia da levedura. Além disso, o comprometimento de outros genes da via de biossíntese da parede celular provoca o aumento da deposição de quitina na parede (Popolo *et al.*, 1997). Munro *et al.* (2007) relataram que a regulação dos genes que codificam quitina sintases em *C. albicans* é controlada por PKC, Calcineurina/ Ca^{+2} e pela via HOG MAP quinase.

Em *S. cerevisiae*, a principal estratégia para lidar com a alta osmolaridade externa é o aumento da concentração de glicerol. O acúmulo de glicerol é um mecanismo adaptativo que permite às células adquirir água do ambiente e recuperar a pressão de turgor. A via HOG MAP quinase responde ao estresse osmótico, e sua ativação induz a expressão de genes requeridos para a adaptação osmótica, incluindo genes da biossíntese do glicerol (Albertin *et al.*, 1994). É proposto que a via HOG MAP quinase também está envolvida na regulação da estrutura da parede celular de *S. cerevisiae* (Kapteyn *et al.*, 2001) e *C. albicans* (Eisman *et al.*, 2006). Também já foi demonstrado que em *C. albicans* mutantes para calcineurina são mais susceptíveis à caspofungina, sugerindo que a calcineurina está envolvida na via de sinalização de resposta a danos na parede (Sanglard *et al.*, 2003), e que em *S. cerevisiae* a perda da função de PKC, que ativa a via de MAP quinase durante o estresse térmico, provoca a lise celular (Kamada *et al.*, 1995).

Por meio de ensaios de gene repórter *lacZ*, foi demonstrado que a expressão de quitina sintases de *C. albicans* em mutantes para genes da via HOG MAP quinase, da via PKC MAP quinase e calcineurina é alterada na presença de equinocandinas, que inibem a síntese de 1-3- β -glicana sintase (Walker *et al.*, 2008). Lenardon *et al.* (2009) analisaram os promotores dos genes de quitina sintases de classe I de *C. albicans* e evidenciaram a presença de sítios para o fator de transcrição Rlm1, e sugerem que a via de sinalização da integridade da parede celular mediada por PKC pode atuar por meio desses elementos nesse organismo. Portanto, a síntese de quitina parece estar regulada em resposta a danos causados na parede celular.

1.4 – Estudo de Promotores e Abordagens Experimentais

Na transcrição do mRNA, a etapa de iniciação é o principal ponto de regulação. Em eucariotos, a iniciação da transcrição é governada pela RNA polimerase II e por fatores de transcrição basais, que direcionam a transcrição basal, e também por fatores regulatórios que se ligam em sítios a montante do sítio de iniciação e regulam a taxa de transcrição (revisto por Conaway e Conaway, 1993). O complexo processo desenvolvido pela célula é regulado em resposta a um sinal particular, que pode gerar a expressão gênica numa célula específica, num determinado tempo, ou em certas condições ambientais. O reconhecimento de mudanças nas condições do ambiente e a habilidade de se adaptar são essenciais para a viabilidade da célula. A regulação da expressão gênica em resposta a um sinal particular pode ser modulada por

ativadores (revisto por Kodadek *et al.*, 2006) ou repressores transcricionais (revisto por Rojo, 2001). A análise da maquinaria transcricional de um gene refere-se à delimitação da região regulatória, o promotor, e à caracterização ou identificação dos fatores transcricionais que nela atuam. A tabela 2 apresenta os sítios na região promotora dos genes 1,3- β -glicana sintase e quitina sintase 4 de *P. brasiliensis* estudados neste trabalho.

Tabela 2. Sítios analisados na região promotora dos genes *Pbfsk1* e *Pbchs4* – As seqüências consenso reconhecidas pelos fatores de transcrição PacC, CreA e FacB e os elementos de resposta ao choque térmico e ao estresse são apresentadas na fita molde e na fita complementar. O sítio para o TATA Box é variável, e corresponde a seqüências ricas em adenina e timina.

	Sítio na Região Promotora (Seqüência consenso 5' - 3')	Descrição
Fator de Transcrição PacC ¹	GCCARG R= A ou G CYTGGC Y= C ou T	Em condições alcalinas e neutras, ativa genes expressos em resposta a essas condições e reprime genes expressos em condições ácidas.
Fator de Transcrição CreA ²	SYGGRG S= C ou G, Y= C ou T e R= A ou G CYCCRS S= C ou G, Y= C ou T e R= A ou G	Media a repressão por glicose.
Fator de Transcrição FacB ³	TCC/G - N ₈₋₁₀ - C/GGA N= qualquer nucleotídeo GCA/C - N ₈₋₁₀ - T/GGC N= qualquer nucleotídeo	Requerido para a utilização de acetato como fonte de carbono.
TATA Box ⁴	TATAAA e variações de seqüências ricas em adenina e timina	A proteína TPB se liga ao TATA Box no promotor para que o complexo de iniciação da transcrição seja formado.
HSE ⁵ (Elemento de Resposta ao Choque Térmico)	NGAAN - N ₀₋₅ - NGAAN - N ₀₋₅ - NGAAN N= qualquer nucleotídeo NTTCN - N ₀₋₅ - NTTCN - N ₀₋₅ - NTTCN N= qualquer nucleotídeo	O fator de transcrição HSF forma um homotrímero e se liga ao sítio denominado HSE no promotor de genes durante a resposta ao choque térmico.
STRE ⁶ (Elemento de Resposta ao Estresse)	CCCCT AGGGG	Identificado no promotor de genes que respondem ao estresse nutricional, térmico, osmótico e oxidativo.

Fontes: ¹Esposito *et al.*, 1997; ²Cubero e Scazzocchio, 1994; ³Todd *et al.*, 1998; ⁴Butler *et al.*, 2002; ⁵Santoro *et al.*, 1998; ⁶Mager e Kuijff, 1995.

Além da análise computacional da seqüência regulatória, o estudo de promotores utiliza diversas outras metodologias, como o sistema de gene repórter *lacZ* e o ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA), utilizadas também neste trabalho.

1.4.1 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

O ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA), metodologia também conhecida como *band shift*, é uma das mais importantes abordagens experimentais para o estudo da regulação da expressão gênica. A técnica é empregada para verificar se um extrato

protéico, proteína purificada ou proteína recombinante interage com uma determinada seqüência de DNA. A estratégia fundamenta-se no fato de que a mobilidade eletroforética de um ácido nucléico altera-se quando uma proteína se liga a ele. O ensaio detecta a formação *in vitro* do complexo DNA-proteína e, para detectar o complexo, a sonda de DNA pode ser marcada com radioatividade ou fluorescência. Nos ensaios clássicos, a proteína e o ácido nucléico são incubados e a solução é submetida à eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida ou agarose. Em geral, o complexo DNA-proteína migra mais lentamente do que o ácido nucléico livre.

Fragmentos clonados de DNA contendo cerca de 50 - 400 pb ou oligonucleotídeos sintéticos de 20 - 70 nucleotídeos funcionam bem em EMSA, e apesar do DNA fita-dupla ser freqüentemente utilizado, o DNA fita-simples também pode ser eficiente. Embora os longos fragmentos de DNA apresentem seqüências regulatórias mais abrangentes, oligonucleotídeos, que em geral contêm menos sítios de ligação, geram informações mais específicas. A escolha das condições de obtenção do extrato protéico é governada pelo objetivo do estudo, e o extrato protéico total ou nuclear é muito útil para a análise de elementos regulatórios do promotor de um gene, embora a utilização de proteínas purificadas e proteínas recombinantes revelem informações importantes sobre as interações (revisto por Laniel *et al.*, 2001).

As interações DNA-proteína detectadas por EMSA não são necessariamente específicas. Para discriminar um evento de ligação inespecífico de um específico são realizados ensaios de competição. Nesses experimentos são utilizadas sondas não marcadas (competidores específicos), idênticas às sondas marcadas. Se a interação inicial entre a sonda marcada e a proteína for específica, o competidor específico adicionado à reação em quantidades crescentes e superiores à sonda marcada irá se ligar preferencialmente à proteína, e a visualização do complexo DNA-proteína será reduzida (revisto por Lin e Barbosa, 2002). A figura 4 apresenta um esquema simplificado do princípio do EMSA.

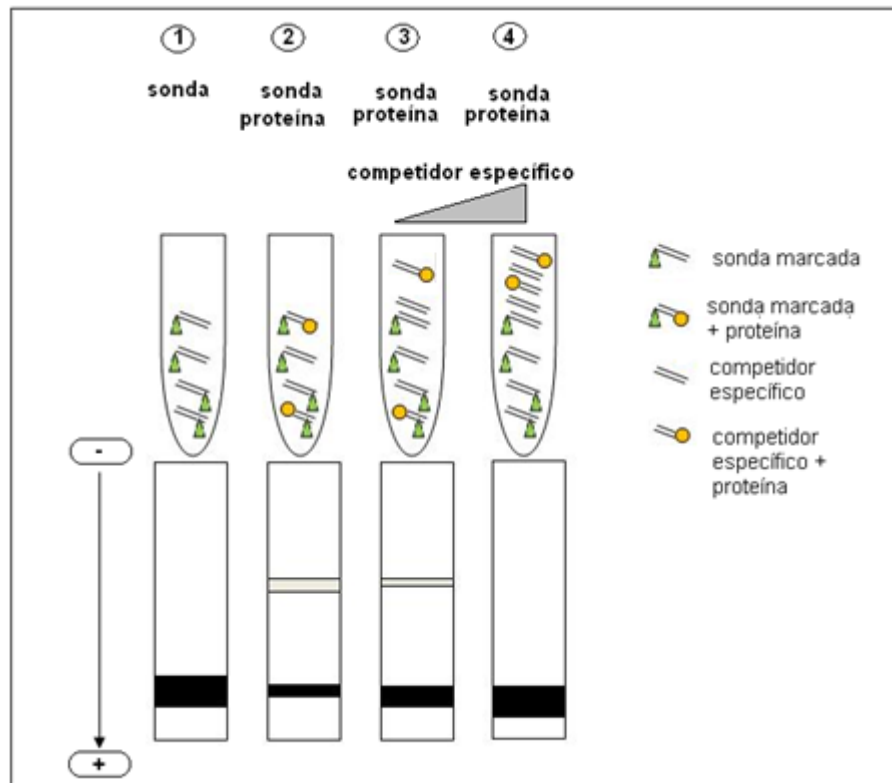


Figura 4. Esquema ilustrativo do Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética – 1: sonda livre; 2: sonda + proteína, ilustrando o complexo DNA-proteína, com maior massa molecular; 3 e 4: sonda + proteína + competidor específico em concentração crescente, ilustrando a redução da visualização do complexo DNA-proteína, visto que a sonda marcada tende a ficar na forma livre em função da competição com a sonda não marcada.

1.4.2– Sistema de Gene Repórter *lacZ*

O sistema de gene repórter é um método utilizado para se estudar a expressão gênica permitindo avaliar o efeito que uma seqüência regulatória, artificialmente inserida a montante do gene repórter, exerce sobre a transcrição deste último. A produção de proteína sintetizada sob várias condições deve refletir a habilidade da seqüência regulatória inserida em promover a transcrição. Os sistemas de gene repórter utilizados no estudo da expressão gênica incluem os que codificam enzimas como cloranfenicol acetil-transferase, luciferase de vaga-lume, fosfatase alcalina, proteína fluorescente verde e β -galactosidase bacteriana (revisto por Lin e Barbosa, 2002).

A enzima β -galactosidase, codificada pelo gene *lacZ* da *Escherichia coli*, é um dos sistemas repórter mais empregados para caracterizar sistemas regulatórios. A figura 5 apresenta o esquema ilustrativo do sistema gene repórter *lacZ*.

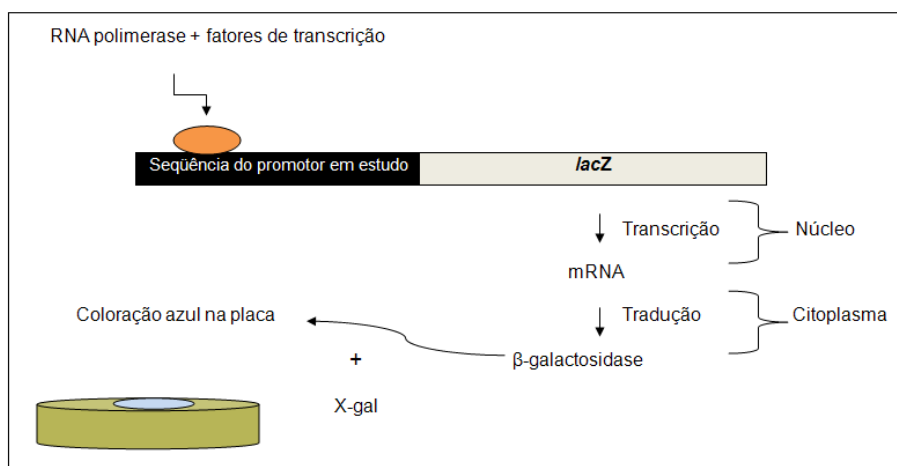


Figura 5. Esquema ilustrativo do sistema de gene repórter *lacZ* – A seqüência do promotor em estudo sob a regulação de fatores de transcrição promove a transcrição do gene *lacZ*, que codifica a proteína repórter β -galactosidase. O substrato X-gal presente no meio em que o organismo transformado está sendo cultivado produz uma coloração azul ao ser clivado pela β -galactosidase.

Conforme observamos na figura 6, no sistema de gene repórter *lacZ* a expressão desse gene é governada pelo promotor em estudo, e a detecção da atividade de β -galactosidase pode revelar a atividade promotora em diferentes condições.

1.5 – Utilização de *Aspergillus nidulans* como Hospedeiro Heterólogo para Estudo da Regulação da Expressão Gênica

A transformação de microrganismos é uma importante estratégia para o estudo da expressão gênica. Espécies de *Aspergillus* podem ser utilizadas como sistemas de expressão para proteínas heterólogas, e utiliza-se a complementação homóloga de um marcador auxotrófico. Para esse fim, freqüentemente são utilizados os genes *pyrA* de *A. níger* e *argB* de *A. nidulans*, ambos considerados bons marcadores (revisto por Lenouvel *et al.*, 2002). Em nosso grupo de pesquisa, temos disponível uma linhagem de *A. nidulans argB*, que apresenta uma mutação no gene *argB* que a torna incapaz de ser cultivada em meio sem arginina.

A transformação eficiente de *A. nidulans* é uma ferramenta já descrita. Tilburn *et al.* (1983) relataram a transformação de uma linhagem de *A. nidulans* que apresentava uma deleção no gene da acetamidase. A transformação foi realizada mediante a incubação de protoplastos, na presença de polietilenoglicol e CaCl_2 , com DNA plasmidial contendo o gene

funcional de acetamidase, sendo observada a integração desse DNA no genoma dos transformantes. Além disso, o sistema de expressão da β -galactosidase, codificada pelo gene *lacZ* de *E. coli*, também já foi descrito com sucesso em *A. nidulans* (van Gorcom *et al.*, 1986), demonstrando a viabilidade da fusão de seqüências regulatórias ao *lacZ* para estudos de expressão gênica nesse hospedeiro. Punt *et al.* (1990) utilizaram o sistema de gene repórter *lacZ* em *A. nidulans* e, realizando mutações no promotor, identificaram elementos na seqüência promotora do gene *gpdA* desse organismo envolvidos na ativação transcricional. A atividade da β -galactosidase foi mensurada a partir de extratos protéicos obtidos dos transformantes cultivados em meio mínimo, sendo possível associar a atividade da β -galactosidase a diferentes deleções no promotor.

É importante considerar também que há fatores inerentes ao sistema heterólogo que podem interferir nos ensaios realizados, visto que o hospedeiro pode apresentar mecanismos de regulação diferentes do modelo estudado. Em estudo realizado por Hsu *et al.* (2008), duas das cinco construções utilizando o sistema gene repórter *lacZ* para analisar a expressão de genes de lipases de *C. albicans* não induziram a atividade de β -galactosidase, sugerindo que os fatores regulatórios necessários para expressão dos genes de *C. albicans* não estariam presentes no hospedeiro, *S. cerevisiae*.

A. nidulans é um fungo ascomiceto, assim como *P. brasiliensis*. Ambos se apresentam em clados relativamente próximos, conforme mostra o agrupamento de espécies de fungos proposto pelo *Fungal Genome Initiative* (FGI) (Figura 6).

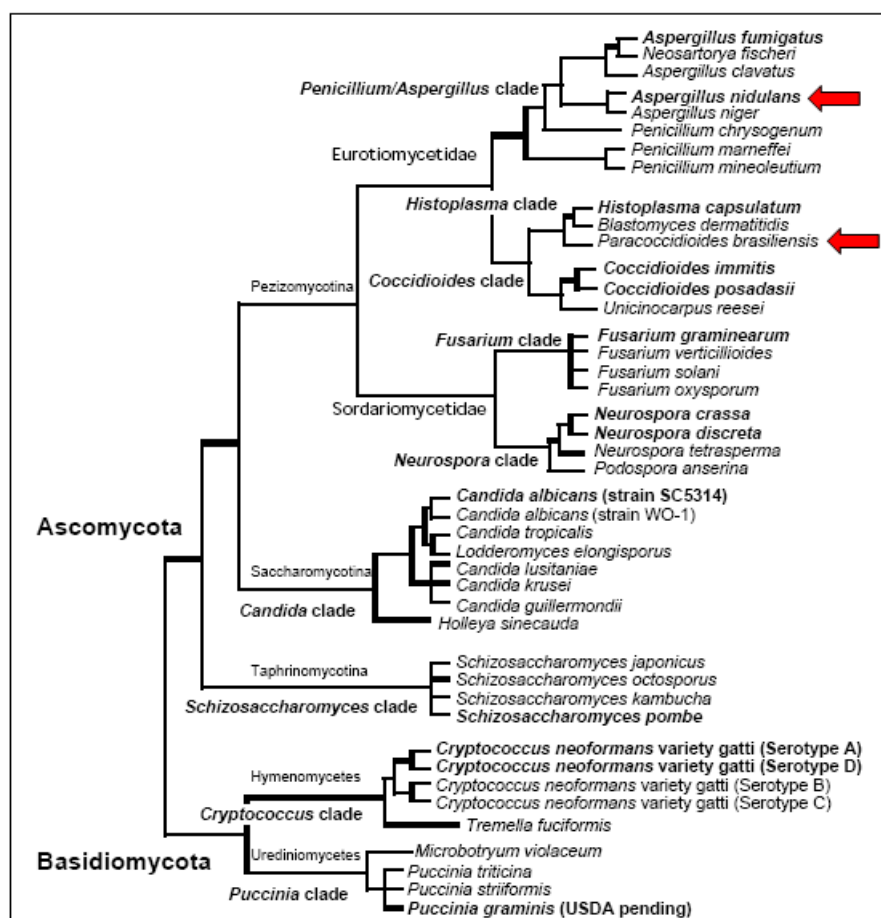


Figura 6. Agrupamento das espécies de fungos, de acordo com a proposta do *Fungal Genome Initiative* (FGI) – A topologia da árvore representa a classificação de proximidade entre os *taxons* selecionados. Os ramos não representam a divergência evolucionária. *A. nidulans* e *P. brasiliensis* estão indicados pelas setas vermelhas. Modificado de Birren, 2003.

A indisponibilidade de um protocolo eficiente e reprodutível para transformação genética de *P. brasiliensis*, a viabilidade de transformação de *A. nidulans* e a eficácia do sistema gene repórter *lacZ* nesse organismo, a disponibilidade de uma linhagem *argB* para utilização de um marcador auxotrófico, e a relativa proximidade entre *A. nidulans* e *P. brasiliensis* sustentaram nossa escolha por *A. nidulans* como hospedeiro heterólogo para estudo da regulação da expressão gênica.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Os estudos de promotores são importantes para compreensão dos mecanismos de regulação da transcrição. Não há dados disponíveis sobre a estrutura e regulação de promotores de *P. brasiliensis*, de forma que a caracterização da seqüência promotora dos genes 1,3- β -glicana sintase (*Pbfks1*) e quitina sintase 4 (*Pbchs4*) é objetivo deste trabalho, que poderá agregar informações sobre a biologia desse fungo patogênico.

2.2– Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a atividade promotora do gene *Pbfks1* utilizando o sistema de gene repórter *lacZ* em *A. nidulans*, verificando diferenças na produção da β -galactosidase quando os transformantes são crescidos em diferentes fontes de carbono;
- 2) Avaliar a expressão do gene *Pbfks1* em culturas de micélio e levedura, e em diferentes fontes de carbono;
- 3) Avaliar se os sítios de ligação identificados na região promotora dos genes *Pbfks1* e *Pbchs4* interagem com fatores de transcrição presentes nos extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis*;
- 4) Avaliar se o sítio de ligação para o fator de transcrição PacC identificado na região promotora do gene *Pbchs4* é funcional e interage com a proteína recombinante que contém o domínio de ligação ao DNA desse fator de transcrição.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Soluções e Soluções Tampão

3.1.1 – Soluções para Meios de Cultura de *A. nidulans*

Solução de Elementos Traço

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	104,80 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,60 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,57 mM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,30 mM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,80 μM

O volume foi completado com H_2O destilada, e o pH ajustado para 2,0.

Solução de Sais

KCl	0,35 M
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 M
KH_2PO_4	0,56 M
Solução de Elementos Traço	50,00 mL

O volume foi completado com H_2O destilada, e a solução autoclavada a 120°C , durante 15 minutos.

Soluções Estoque de Suplementos (100X)

Cada um dos suplementos foi dissolvido em H_2O bidestilada, e todas as soluções esterilizadas por filtração em membrana de nitrocelulose com poros de $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore). As soluções foram preparadas nas seguintes concentrações (100X):

Solução Estoque de Tartarato de Amônio 9,20% (p/v)

Solução Estoque de Ácido Paraminobenzóico 0,02% (p/v)

Solução Estoque de D-biotina 0,01% (p/v)

Solução Estoque de L-metionina 2,98% (p/v)

Solução Estoque de Arginina 5,30% (p/v)

3.1.2 – Soluções Tampão para Transformação de *A. nidulans*

O volume das soluções foi completado com H₂O destilada. A esterilização foi realizada por filtração em membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 µm (Millipore). As soluções foram preparadas nas seguintes concentrações:

Solução A (para Tampão de Transformação 1)

MgSO₄ 1,2 M

Na₂HPO₄ 10,0 mM

Solução B (para Tampão de Transformação 1)

MgSO₄ 1,2 M

NaH₂PO₄ 10,0 mM

Tampão de Transformação 1

MgSO₄ 1,2 M

Na₂PO₃ 10,0 mM

Para o preparo do tampão de transformação 1 misturou-se 80 mL da solução A com aproximadamente 20 mL da solução B, até atingir o pH 5,8.

Tampão de Transformação 2

Sorbitol	0,6 M
Tris-HCl	100,0 mM

Ajustou-se o pH para 7,0.

Tampão de Transformação 3

Sorbitol	1,0 M
Tris-HCl	10,0 mM

Ajustou-se o pH para 7,5.

Tampão de Transformação 4

Sorbitol	1,0 M
Tris-HCl	10,0 mM
CaCl ₂	10,0 mM

Ajustou-se o pH para 7,5.

Tampão de Transformação 5

PEG 8000	60,0 % (p/v)
Tris-HCl	10,0 mM
CaCl ₂	10,0 mM

Ajustou-se o pH para 7,5.

3.1.3 – Soluções para Extração de DNA Total dos Transformantes de *A. nidulans*

Solução de Sais (extração de DNA)

Tris-HCl pH 7,5	100,0 mM
EDTA	5,0 mM
NaCl	1,4 M
DTT	1,0 mM

Imediatamente antes da utilização, adicionar RNase para a concentração final de 100 g/mL.

Clorofil

Clorofórmio	24,0 v
Álcool Isoamílico	1,0 v

A solução foi homogenizada repetidas vezes com Tris-HCl 100 mM pH 7,6.

Clorofane

Fenol (equilibrado em pH 7,6)	1,00 v
Clorofórmio	1,00 v
β -hidroxiquinolina	0,05% (p/v)

Equilibrou-se a solução com Tris-HCl 100 mM pH 7,6.

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10,0 mM
EDTA	1,0 mM

3.1.4 – Soluções para Extração de Proteínas de *P. brasiliensis*

Tampão de Lise

HEPES pH 7,5	25,0 mM
KCL	50,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM
EDTA	0,1 mM
Glicerina (v/v)	10,0 % (v/v)
DTT	0,5 mM
PMSF	1,0 mM
Pepstatina	1,0 µM
Leupeptina	0,6 µM

O DTT e os inibidores de protease PMSF, Pepstatina e Leupeptina foram adicionados no momento da utilização do tampão.

Tampão de Eluição do Extrato Protéico

HEPES pH 7,9	25,0 mM
KCl	50,0 mM
MgCl ₂	50,0 mM
EDTA	1,0 mM
DTT	1,0 mM

O DTT foi adicionado no momento da utilização do tampão

3.1.5 – Soluções para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante - SDS-PAGE

Solução de Policrilamida 30% (p/v)

Diluiu-se em H₂O destilada acrilamida e bisacrilamida na proporção de 29:1, respectivamente.

Tampão de amostra (2X)

Tris-HCl	200,0 mM pH 6,8
SDS	4,0% (v/v)
β -mercaptoetanol	4,0% (v/v)
Glicerol	20,0% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

Foram preparadas alíquotas de 1 mL, estocadas a -20°C.

Tampão de corrida (5X)

Tris Base	125,00 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,50 % (p/v)

Solução corante

Azul brilhante de Comassie R-250	0,25 % (p/v)
Metanol	30,00 % (v/v)
Ácido acético glacial	7,00 % (v/v)

Dilui-se em H₂O destilada e filtrou-se em papel de filtro.

Solução descorante

Metanol	30,0 % (v/v)
Ácido acético glacial	7,0 % (v/v)

3.1.6 – Soluções para o Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

Solução de Poliacrilamida

Acrilamida e bisacrilamida foram diluídas em H₂O Milli Q na proporção de 30,00:0,36 (p/v), respectivamente, e a solução filtrada em membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (Millipore).

Solução de Alta Concentração de Sal para Purificação da Sonda

Tris Base	0,06 g
EDTA	0,02 g
NaCl	4,30 g

O volume foi completado com H₂O destilada para 50 mL.

TEB 10X

Tris Base	54,0 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA	15,0 g

O volume foi completado com H₂O destilada para 500 mL, e ajustou-se o pH para 8, (com Tris ou ácido bórico).

3.2 – Meios de Cultura

Meio LB

Extrato de Levedura	0,5 % (p/v)
Peptona de Caseína	1,0 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)

O volume foi completado com H₂O destilada, e o pH ajustado para 7,0. Para meio sólido, foi utilizado 1,4% (p/v) de ágar. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Meio Fava-Neto

Protease peptona	0,3 % (p/v)
Peptona	1,0 % (p/v)
Extrato de carne	0,5 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)
Glicose	4,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
Ágar	1,6 % (p/v)

O volume foi completado com H₂O destilada, e o pH ajustado para 7,0. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Meio YPD

Extrato de levedura	1,0 % (p/v)
Peptona de Caseína	2,0 % (p/v)
Glicose	2,0 % (p/v)

O volume foi completado com H₂O destilada, e o pH ajustado para 7,2. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Meio Mínimo para *A. nidulans*

Solução de Sais	2,0 % (v/v)
Glicose	1,0 % (p/v)

O volume foi completado com água de torneira, e o pH ajustado para 6,8. Para meio sólido, foi utilizado 2% (p/v) de ágar. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Meio Mínimo Base para Transformação de *A. nidulans*

Solução de Sais	2,0 % (v/v)
Glicose	1,0 % (p/v)
Sacarose	1,0 M
Ágar	2,0 % (p/v)

O volume foi completado com água de torneira, e o pH ajustado para 6,8. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Meio Mínimo de Cobertura para Transformação de *A. nidulans*

Solução de Sais	2,00 % (v/v)
Glicose	1,00 % (p/v)
Sacarose	1,00 M
Agarose	0,35 % (p/v)

O volume foi completado com água de torneira, e o pH ajustado para 6,8. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Meio Completo para *A. nidulans*

Solução de Sais	2,00 % (v/v)
Glicose	1,00 % (p/v)
Caseína hidrolisada	0,15 % (p/v)
Peptona	2,00 % (p/v)
Extrato de levedura	0,05 % (p/v)

O volume foi completado com água de torneira, e o pH ajustado para 6,8. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

3.3 – Linhagens Microbiológicas

3.3.1 – *Escherichia coli*

Para a transformação com o vetor gene repórter para preparação de plasmídeos em larga escala foi utilizada a linhagem bacteriana *E. coli* XL10-Gold. Para a expressão do domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis* foi utilizada a linhagem bacteriana *Escherichia coli* BL21(DE3). Células termo-competentes das duas linhagens foram previamente preparadas.

3.3.2 – *Aspergillus nidulans*

A linhagem de *A. nidullans* utilizada para transformação com o vetor gene repórter foi a *argB*: *pabaA1*, *biA1*, *methG1*, *argB*. Essa linhagem apresenta o gene *argB* mutado, o que impossibilita o crescimento do fungo na ausência de arginina. O fungo foi cultivado em meio mínimo ágar suplementado com tartarato de amônio, ácido paraminobenzóico, D-biotina, L-metionina e arginina, todos na concentração final de 1X, e incubado a 30°C durante aproximadamente 4 dias, até a esporulação. Os transformantes mitoticamente estáveis foram mantidos nas mesmas condições, mas sem suplementação de arginina.

3.3.3 – *Paracoccidioides brasiliensis*

Para obtenção de culturas de levedura e de micélio de *P. brasiliensis*, foi utilizado o estoque de levedura do isolado Pb01 disponível no Laboratório de Biologia Molecular da UnB. Foi feito um inóculo de leveduras na concentração final de 10⁶ células/mL em meio YPD, e a cultura foi crescida a 37°C sob agitação de 250 rpm, por uma semana. Para obtenção de micélio, o mesmo inóculo de leveduras foi realizado, mantendo-se a cultura a 24°C por

uma semana para ocorrência da transição dimórfica, com um cultivo adicional de uma semana para o crescimento do micélio.

3.4 – Vetor Gene Repórter

O vetor gene repórter 42B da série pAN923, utilizado na transformação de *A. nidulans* neste trabalho, foi construído por van Gorcom *et. al.* (1986). O plasmídeo contém um sítio para a enzima de restrição *Bam* HI que permite a clonagem do inserto de interesse a montante do gene *lacZ* de *E. coli*. Após a transformação da linhagem *argB*⁻ de *A. nidulans*, o vetor que carrega o gene *argB* é integrado com uma alta eficiência ao locus *argB* do genoma, geralmente como uma cópia única (van Gorcom, 1986). A figura 7 apresenta em esquema do vetor gene repórter utilizado em nosso trabalho.

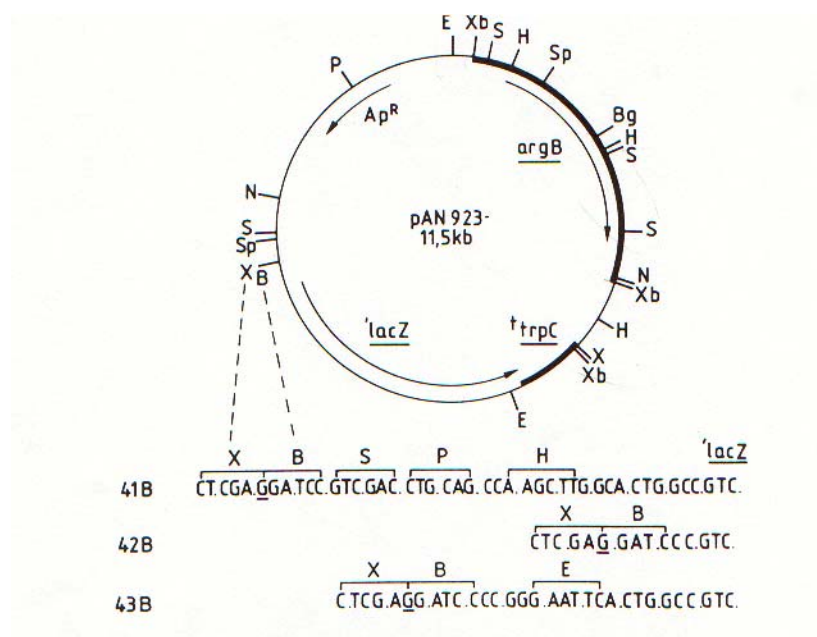


Figura 7. Esquema dos vetores da série pAN923 – Fragmentos de promotores podem ser clonados a montante do *lacZ*. Linhas espessas representam DNA de *Aspergillus*; linhas finas representam DNA de *E. coli*. B, *Bam* HI; Bg, *Bgl* II; E, *Eco* RI; H, *Hind* III; N, *Nru* I; P, *Pst* I; S, *Sal* I; Sp, *Sph* I; X, *Xho* I; Xb, *Xba* I. Retirado de van Punt *et al.*, 1990.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, com a participação de Thiago Daison e Carine Pessoa, foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação da região promotora dos genes 1,3-β-glicana sintase (*Pbfsk1*) e de quitina sintase 4 (*Pbchs4*) de *P. brasiliensis*, criando nas extremidades 5' e 3' sítios para a enzima de restrição *Bam* HI. As

seqüências foram clonadas no vetor pGEM-T, seqüenciadas e transferidas para o vetor gene repórter 42B da série pAN923, a montante do gene *lacZ*.

3.5 – Sistema de Gene Repórter *lacZ* para Análise da Região Promotora do gene 1,3-β-glicana sintase de *P. brasiliensis*

3.5.1 – Preparação de Células de *E. coli* Termo-Competentes

Foi feito um pré-inóculo de uma colônia individual de *E. coli* XL10-Gold em 5 mL de meio LB com ampicilina a 100 µg/mL, incubado por 18 horas a 37°C sob agitação de 250 rpm. A partir do pré-inóculo, foi feito um inóculo de 500 µL em 50 mL de meio LB, com incubação a 37°C sob agitação de 250 rpm até atingir a OD₆₀₀ de 0,2 a 0,3 (início da fase exponencial de crescimento bacteriano). Coletou-se a cultura por centrifugação a 5.000 g a 4°C por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o sedimento com suave agitação em 10 mL de solução de CaCl₂ 100 mM e glicerol 15% gelada. Todo o procedimento foi realizado mantendo a suspensão de células no gelo. O material foi submetido a uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. Ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL da solução CaCl₂ 100 mM e glicerol 15% gelada. Foram feitas alíquotas de 100 µL para estocagem a -80°C.

3.5.2 – Transformação de *E. coli* com o Vetor Gene Repórter

A transformação da linhagem XL10-Gold de *E. coli* com o vetor gene repórter contendo a região promotora do gene *Pbfs1* foi realizada por choque térmico. A 100 µL de células competentes adicionou-se gentilmente 50 ng do plasmídeo e incubou-se no gelo por 1 hora. Posteriormente, as células foram incubadas em banho a 42°C por 90 segundos e, imediatamente após esse período, foram transferidas para o gelo. Adicionou-se 1 mL de meio LB à mistura de transformação, que foi incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm por 1 hora. Foram semeados 200 µL da solução de transformação e o restante do material foi centrifugado a 3.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 350 µL de meio LB, semeando-se 200 µL e 150 µL da ressuspensão. As três semeaduras foram feitas em meio LB ágar contendo ampicilina a 100 µg/mL, com

posterior incubação em estufa a 37°C por 16 horas. Os clones selecionados foram inoculados em 5 mL de meio LB contendo ampicilina a 100 µg/mL e incubados a 37°C sob agitação de 250 rpm por 16 horas. Posteriormente, para estocagem a -80°C, foram utilizados 500 µL de cultura armazenados com 500 µL de glicerol 70% estéril.

3.5.3– Preparação de Plasmídeos em Larga Escala

A partir das células transformadas com o vetor gene repórter contendo a região promotora do gene *Pbfks1*, foi realizada uma preparação de plasmídeos em larga escala. Foi feito um pré-inóculo de 10 µL das células armazenadas em glicerol em 5 mL de meio LB, contendo ampicilina a 100 µg/mL, e incubou-se a 37°C sob agitação de 250 rpm por 16 horas. Posteriormente, foi feito um inóculo de 400 µL da cultura crescida a partir do pré inóculo em 500 mL de meio LB, contendo ampicilina a 100 µg/mL, e incubou-se a 37°C sob agitação de 250 rpm por 16 horas. A preparação de plasmídeos em larga escala foi feita utilizando-se o Plasmid Maxi Kit (QIAGEN), conforme instruções do fabricante. O DNA plasmidial obtido na preparação foi posteriormente utilizado para a transformação genética de *A. nidulans*.

3.5.4 – Digestão do Vetor Gene Repórter

O produto obtido na preparação de plasmídeos em larga escala foi digerido com a enzima de restrição *Bam* HI (Promega) para confirmação do perfil de restrição, esperando-se a liberação do inserto correspondente ao fragmento do promotor do gene *Pbfks1* clonado no vetor gene repórter. A reação de digestão foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo 1 µg do vetor, 10 unidades da enzima *Bam* HI e 1X do tampão da enzima. A reação foi incubada em banho à 37°C por 3 horas. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

3.5.5 – Preparação de Protoplastos e Transformação de *A. nidulans* com o Vetor Gene Repórter

Para preparação de protoplastos, os esporos de *A. nidulans* crescido em placa contendo o meio mínimo foram coletados com Tween 80 0,01%. Foi feito um inóculo de 10^8 esporos em 250 mL de meio mínimo suplementado com as soluções de tartarato de amônio, ácido paraminobenzóico, D-biotina, L-metionina e arginina, todos na concentração final de 1X, com posterior incubação a 30°C sob agitação de 250 rpm por 16 horas. O micélio foi coletado por filtração em tecido estéril e lavado com água de torneira autoclavada gelada, e em seguida ressuspensionado em 10 mL de Tampão de Transformação 1 pré-resfriado. O micélio foi submetido a uma vigorosa agitação em tubo *Falcon* a fim de desfazer os grumos e otimizar o acesso das enzimas às células na etapa posterior. Após ser transferido para frasco *Erlenmeyer*, adicionou-se 2 mL de solução estéril de Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (SIGMA) a 20 mg/mL em Tampão de Transformação 1, e 300 µL de solução de albumina sérica bovina estéril a 10 mg/mL, também em Tampão de Transformação 1. Após incubação de 5 minutos no gelo, o micélio foi incubado a 30°C sob agitação de 250 rpm por 2 horas, sendo ressuspensionado com pipeta de 5 mL a cada 30 minutos para otimizar a lise da parede celular. A formação dos protoplastos foi observada ao microscópio óptico. Após o período de incubação, foi feita uma filtração em gaze e posteriormente outra em lã de vidro para aumentar o grau de pureza da solução de protoplastos, removendo restos de micélio. Os protoplastos foram então transferidos para tubo *Corex*, e adicionados cuidadosamente 10 mL de Tampão de Transformação 2. As centrifugações posteriores foram realizadas em rotor *swing-out* na centrífuga SORVAL (RC-5 Super Speed Refrigerated). Foi realizada uma centrifugação a 670 g por 10 minutos a 4°C para formação de um gradiente, de forma a obter os protoplastos na interface do tampão. Os protoplastos foram coletados utilizando-se pipeta *Pasteur* de vidro e transferidos para um novo tubo *Corex*. Foram adicionados 15 mL de Tampão de Transformação 3 seguindo-se uma centrifugação a 1.200 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes em 15 mL de Tampão de Transformação 4, submetido a centrifugação de 1.200 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os protoplastos foram ressuspensionados em um volume apropriado de Tampão de Transformação 4 de modo a se obter uma concentração de 10^5 a 10^6 protoplastos/µL.

Para a transformação genética de *A. nidulans*, 10 µg de vetor gene repórter contendo a região promotora do gene *Pbfks1*, previamente dissolvidos em Tampão de Transformação 4, foram misturados cuidadosamente com 100 µL da solução de protoplastos. Foram adicionados 50 µL de Tampão de Transformação 5 e a mistura foi realizada gentilmente, com posterior incubação no gelo por 20 minutos. Mais 0,5 mL de Tampão de Transformação 5 foram adicionados cuidadosamente, e em seguida foi feita uma nova incubação à temperatura ambiente por 20 minutos. A solução de transformação foi centrifugada a 13.000 g por 5 minutos, e o sobrenadante removido por aspiração. Uma nova centrifugação a 13.000 g por 1 minuto foi realizada para remoção do tampão remanescente. A transformação foi ressuspensa em 200 µL de Tampão de Transformação 4 e adicionada a 3 mL de meio mínimo de cobertura fundido e mantido a 45°C. O meio foi vertido sobre placas de meio mínimo base e incubado em estufa a 30°C por 3-4 dias para crescimento dos transformantes. Para transformação com o vetor do sistema gene repórter, e também para a transformação com vetor sem inserto como controle, o meio mínimo de cobertura e o meio mínimo base foram suplementados com as soluções de tartarato de amônio, ácido paraminobenzóico, D-biotina, L-metionina e arginina, todos na concentração final de 1X. Para o teste da viabilidade de protoplastos, o protocolo de transformação foi realizado sem adição de DNA, e os meios suplementados com todos os requerimentos auxotróficos descritos acima, acrescentando-se arginina.

3.5.6 – Ensaio de Estabilidade Mitótica

A fim de selecionar transformantes mitoticamente estáveis, foram realizadas 4 sementeiras em meio mínimo ágar sem arginina, alternadas por sementeiras em meio mínimo ágar com arginina. Dessa forma, espera-se selecionar os transformantes que tenham integrado o DNA plasmidial no genoma, visto que mantiveram a marca de seleção na ausência de pressão seletiva. Os suplementos tartarato de amônio, ácido paraminobenzóico, D-biotina, L-metionina foram utilizados na concentração final de 1X, assim como a arginina, quando necessário.

3.5.7 – Extração de DNA Total dos Transformantes de *A. nidulans*

Para extração de DNA total, os esporos dos transformantes crescidos em placas contendo o meio mínimo foram inoculados em 50 mL de meio completo e incubados sob agitação de 250 rpm, a 30°C, durante a noite.

O micélio foi filtrado e macerado com N₂ líquido em gral e pistilo de porcelana. Foram adicionados 500 µL de solução de sais e o material foi submetido a uma vigorosa agitação. Posteriormente, o macerado foi incubado a 75°C por 10 minutos, e novamente submetido a uma agitação. Foram adicionados 500 µL de clorofane, e após a homogeneização o material foi centrifugado 13.000 g por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e foi adicionado 1 mL de clorofil, com centrifugação nas mesmas condições anteriores. A extração com o clorofil foi realizada 2 vezes. O DNA foi precipitado em 1 mL de isopropanol e resuspendido em tampão TE.

3.5.8 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Amplificação de um Fragmento do Promotor do Gene *Pbfks1* dos Transformantes de *A. nidulans*

Para a confirmação da transformação de *A. nidulans* com o vetor gene repórter contendo a região promotora do gene *Pbfks1*, o DNA extraído dos transformantes foi submetido a uma PCR. Utilizou-se um conjunto de iniciadores específicos para a amplificação de um fragmento do promotor do gene *Pbfks1* (tabela3).

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação de um fragmento do promotor do gene *Pbfks1* dos transformantes de *A. nidulans* – As sequências dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* são apresentadas.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' - 3')	Tm	Fragmento Amplificado (DNA genômico)
FKS Fb	GCCAAGGATCCCTGACACATTC	58,1°C	814 pb
FKS R	GGTTAAACGGATCCTCAAATTTCTCG	56,3 °C	

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir do DNA genômico de *P. brasiliensis*, e apresentam sítios artificialmente inseridos para a enzima de restrição *Bam* HI requeridos para a clonagem no vetor gene repórter. A Tm (*melting temperature*) foi obtida pela ferramenta *Oligo Analyser*, disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L, contendo 1 μ L de DNA extraído (item 3.5.7), 0,2 mM de dNTPs; 0,8 μ M dos iniciadores específicos para o promotor, 0,5 U da enzima *Taq polimerase* (CENBIOT), 1X de tampão da enzima (CENBIOT), e 2,0 mM de cloreto de magnésio (CENBIOT). As reações foram submetidas ao seguinte programa no termociclador: 1) 94°C/2 min; 2) 94°C/40 seg; 3) 55°C/40 seg; 4) 72°C/1 min; 5) 30 repetições a partir do passo 2; 6) 72°C/5 min; 7) 4°C (fim da PCR).

Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL).

3.5.9 – Ensaio em Placa da Atividade de β -galactosidase

Os transformantes de *A. nidulans* que apresentaram resultado positivo na amplificação de um fragmento do promotor do gene *Pbfks1* foram submetidos ao ensaio em placa para detecção da atividade de β -galactosidase. Os transformantes foram cultivados em meio mínimo ágar suplementado com tartarato de amônio, ácido paraminobenzóico, D-biotina, L-metionina, todos na concentração final de 1X, e incubados a 30°C durante aproximadamente 24 horas para obtenção de micélio. Posteriormente, pequenos fragmentos de micélio foram transferidos com ajuda de palito estéril para as placas contendo meio mínimo ágar sem glicose, com acréscimo dos suplementos descritos acima e X-gal a 40 μ g/mL. Foram testadas como fontes de carbono: glicose e acetato de sódio na concentração final de 2%. Cada fonte de carbono foi adicionada ao meio durante a preparação das placas. Os transformantes foram incubados a 30°C por aproximadamente 3 dias.

3.6 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética para Análise da Região Promotora dos Genes 1,3- β -glicana sintase e quitina sintase 4 de *P. brasiliensis*

3.6.1 – Extração de Proteínas de *P. brasiliensis*

As culturas de levedura e de micélio (item 3.3.3) foram centrifugadas a 3.000 g por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. As células foram maceradas com nitrogênio líquido em

gral e pistilo de porcelana, e imediatamente foram adicionados 4 mL de tampão de lise. O material foi submetido a uma vigorosa agitação em tubo *Falcon* com pérolas de vidro a fim de otimizar a quebra da parede celular. Posteriormente, o material foi sonicado na potência de 70% com 2 pulsos de 59 segundos, com 3 repetições, mantendo-se a preparação sempre no gelo. Em seguida, foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na concentração final de 0,4 M, e o material submetido a uma centrifugação a 25.000 g por 90 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e adicionou-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pó na concentração final de 0,405 g/mL, seguindo-se uma nova centrifugação a 7.600 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 2 mL de tampão de eluição do extrato protéico. A coluna de dessalinização (PD 10 column Pharmacia Biotech) foi equilibrada com 25-30 mL de tampão de lise, tomando-se o cuidado de não deixar a coluna secar. Os 2 mL da preparação de extrato protéico foram então aplicados na coluna. O material foi eluído com 3,5 mL do tampão de lise, e as frações coletadas em tubo *eppendorf* contendo glicerol na concentração final na ordem de 20%.

3.6.2 – Produção e Purificação do Domínio de Ligação ao DNA da Proteína PacC de *P. brasiliensis*

Para a produção da proteína recombinante PacCPb-GST (39,2 kDa: 13,2 kDa do domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis* + 26 kDa da proteína Glutathione-S-transferase), a clonagem do domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis* no vetor de expressão foi realizada previamente por Thiago de Melo em nosso grupo de pesquisa, de acordo com as seguintes especificações: a região correspondente ao domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis* foi amplificada a partir do cDNA de *P. brasiliensis* (o iniciador *foward* apresentava um sítio de *Bam* HI e o iniciador *reverse* um sítio de *Xho* I). O amplicon de *P. brasiliensis* possui 349 pb. O inserto foi clonado inicialmente no pGEM-T, seqüenciado e subclonado no vetor de expressão pGEX-4T2, por meio de uma clonagem direcionada *Bam* HI/*Xho* I.

Preparo de células competentes e transformação

Para a produção da proteína recombinante PacCPb-GST foi utilizada a linhagem bacteriana *E. coli* BL21(DE3). Esta linhagem bacteriana não possui marca de seleção.

Portanto, os meios de cultivo para manutenção da cultura e para a preparação de células competentes foram preparados sem antibiótico. Para transformação com o vetor de expressão pGEX-4T2 (contendo a construção PacCPb-GST), as alíquotas de células competentes de BL21(DE3) foram preparadas na hora, não se utilizando estoques congelados. Utilizou-se o protocolo padrão para preparação de células competentes e transformação por choque térmico (semelhante aos itens 3.5.1 e 3.5.2).

Seleção dos clones produtores

Foram preparadas placas de meio LB ágar, uma contendo ampicilina (100 µg/mL) e a segunda contendo ampicilina e 1 mM de IPTG. Os clones transformantes foram semeados nas duas placas, e estas armazenadas a 37°C por 6-7 horas. Os clones que apresentaram menor crescimento na placa com IPTG, mas que cresceram normalmente na placa apenas com ampicilina, foram selecionados para o pré-inóculo (4 clones). Os pré-inóculos foram realizados em frasco de cultura contendo 4 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL), e incubados a 37 °C por 6 horas, sob agitação. Foram transferidos 50 µL do pré-inóculo para frasco contendo 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL), com posterior incubação sob agitação a 250 rpm, a 37 °C durante a noite. Em 250 mL de meio LB (em frasco de 1.000 mL), suplementado com ampicilina (100 µg/mL), foram inoculadas as bactérias crescidas durante a noite (escolhidos 2 dos 4 inóculos da noite anterior) para uma $OD_{600} = 0,2 - 0,3$. Os inóculos foram incubados a 37 °C até que a OD_{600} atingisse 0,6. A indução da expressão protéica foi feita pela adição de IPTG 0,1 mM final, com incubação a 30°C por 5 horas, sob agitação de 250 rpm. As culturas foram centrifugadas a 3.000 g a 4 °C, por 10 minutos.

Equilíbrio da Coluna de GST-Sefarose (GE Healthcare) – GSTrap FF 1mL

A coluna foi lavada com 25 mL de tampão de equilíbrio [PBS pH 7,3 (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM)] a uma taxa de 2 mL/min. O sedimento de células obtido a partir dos clones produtores foi ressuspenso em 4 mL de tampão de equilíbrio, adicionando-se inibidores de protease (Pepstatina 1 µM, Leupeptina 2 µM, PMSF 10 µM) imediatamente antes do uso, e transferido para tubo de centrifuga de 40 mL. Adicionou-se 0,1 V de uma solução de 10 mg/mL de lisozima em 25mM de Tris-HCl pH 8.0.

Foi realizada uma sonicação da solução nas seguintes condições: potência 40%, *pulse on*: 59 segundos, *pulse off*: 2 segundos, mantendo-se o tubo no gelo. O procedimento foi repetido 2 vezes. A suspensão foi centrifugada a 2.350 g por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µM e transferindo para tubo *Falcon* novo. Uma alíquota do lisado celular foi guardada para análise posterior em gel de policacrilamida.

Recuperação das proteínas recombinantes

A solução de proteínas filtrada foi aplicada na coluna de GST-sefarose a uma taxa de 0,5-1 mL/min. Sugere-se, caso a solução esteja muito viscosa, que a amostra seja diluída em PBS contendo os inibidores de protease (conforme a etapa seguinte). A coluna foi lavada com 20 mL de PBS contendo inibidores de protease (Pepstatina 1 µM, Leupeptina 2 µM, PMSF 10 µM), adicionados imediatamente antes do uso. A lavagem da coluna foi feita a uma taxa de 1 mL/min. As proteínas foram eluídas com 5-10 mL de Tampão de Eluição (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; Glutathione reduzida 10 mM), contendo inibidores de protease (Pepstatina 1 µM, Leupeptina 2 µM, PMSF 10 µM), adicionados imediatamente antes do uso. As frações foram coletadas em tubo tipo *ependorf* contendo glicerol (a concentração final de glicerol deve ser da ordem de 20%). As alíquotas foram estocadas a -80°C. A análise das proteínas foi feita em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

3.6.3 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante - SDS-PAGE

A análise de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi realizada conforme as condições descritas por Azevedo *et al.*, 2003. A preparação do gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Reagente	Gel Separador 12%	Gel Concentrador 5%
H ₂ O destilada	3,30 mL	3,40 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30% (29:1)	4,00 mL	0,83 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,50 mL	-
Tris-HCl 1,0 M pH 6,8	-	0,63 mL
SDS 10%	100,00 µL	50,00µL
TEMED	4,00 µL	5,00 µL
Persulfato de amônio 10%	100,00 µL	50,00 µL

Para montagem do gel, primeiramente foi realizada a polimerização do gel separador, (preenchendo aproximadamente 2/3 da placa), cobrindo a superfície com butanol. Após a polimerização, o butanol foi descartado e a placa lavada com H₂O destilada. Em seguida, foi realizada a polimerização do gel concentrador. Após a polimerização, a cuba foi preenchida com tampão de corrida 1X e os poços do gel foram lavados exaustivamente com esse tampão a fim de retirar resíduos de poliacrilamida não polimerizada. As amostras de proteínas foram fervidas em tampão de amostra 1X por 5 minutos, e aplicadas no gel. A eletroforese procedeu a 25 mA até que o azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, começasse a sair da placa. Após a corrida eletroforética, o gel foi mantido na solução corante durante a noite. Posteriormente, o gel foi lavado com solução descorante, trocando-se a solução até que a resolução do gel fosse satisfatória para visualização.

3.6.4 – Análise da Seqüência Promotora dos Genes *Pbfks1* e *Pbchs4* e Desenho das Sondas para EMSA

A análise da seqüência promotora dos genes *Pbfks1* (número de acesso no GenBank AF148715) e de *Pbchs4* (número de acesso no GenBank EF654132) foi realizada visando a busca de sítios para os fatores de transcrição PacC, CreA e FacB, e também para os elementos de resposta ao estresse (STRE) e para os elementos de resposta ao choque térmico (HSE). Submetemos a seqüência dos oligonucleotídeos utilizados como sondas para análise no site TESS (*Transcription Element Search System*, disponível em <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>). Essa ferramenta prediz sítios de ligação para fatores de transcrição presentes na seqüência submetida, utilizando os bancos de dados TRANSFAC, JASPAR, IMD, e/ou CBIL-GibbsMat. O resultado fornecido pelos bancos de dados foi analisado para triagem em busca de sítios que de fato sejam relevantes para o organismo em estudo, visto que os resultados fornecem sítios para fatores de transcrição de diversos organismos.

Para cada sonda referente à região promotora dos genes *Pbfks1* ou *Pbchs4*, foram sintetizados 2 oligonucleotídeos *senso*, sendo um marcado com fluorescência para uso nas reações e outro não marcado para ensaios de competição específica; e um oligonucleotídeo *anti-senso* para realização do anelamento com as sondas *senso*. Para o ensaio de competição com sondas mutadas também foram desenhados oligonucleotídeos *senso* e *anti-senso*, ambos não marcados com fluorescência. Em nossos ensaios, também testamos sondas de *Humicola*

grisea referentes ao promotor do gene PacC desse organismo (*HgPacC*). A tabela 4 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos utilizados em EMSA.

Tabela 4. Sondas utilizadas em EMSA - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de retardo da mobilidade eletroforética. Os oligonucleotídeos indicados por FAM foram marcados com fluoróforo carboxifluoresceína.

Nome da Sonda	Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Posição no Promotor
Sonda <i>Pbfs1</i> (a)	<i>senso</i> FAM	ATTACGAGCTACACCTCTCTCCTATATAGCCCGTCGAAGGAAGAAGAGAAAAT	
Competidor específico	<i>anti-senso</i>	ATTTCTCTTCTTCCTTCGACGGGCTATATAGGAGAGAGGTGTAGCTCGTAAT	
	<i>senso</i>	ATTACGAGCTACACCTCTCTCCTATATAGCCCGTCGAAGGAAGAAGAGAAAAT	
Competidor Mut1(TATA)	<i>anti-senso</i>	ATTTCTCTTCTTCCTTCGACGGGCTATATAGGAGAGAGGTGTAGCTCGTAAT	-342 a -393 (<i>Pbfs1</i>)
	<i>senso</i>	ATTACGAGCTACACCTCTCTCCCCCGCCCGTCGAAGGAAGAAGAGAAAAT	
Competidor Mut2(HSE)	<i>anti-senso</i>	ATTTCTCTTCTTCCTTCGACGGGCGGGGGGAGAGAGGTGTAGCTCGTAAT	
	<i>senso</i>	ATTACGAGCTACACCTCTCTCCTATATAGCCCGTCGCCGCGCCGAGCCAT	
Sonda <i>Pbchs4</i> (a)	<i>Senso</i> FAM	CCCTCCTCCCCCTTTTTTCCCTCGCCAGGGCTAAAGG	
	<i>anti-senso</i>	CCTTTAGCCCTGGCGAGGGGAAAAAAGGGGGAGGAGGG	
Competidor específico	<i>senso</i>	CCCTCCTCCCCCTTTTTTCCCTCGCCAGGGCTAAAGG	
	<i>anti-senso</i>	CCTTTAGCCCTGGCGAGGGGAAAAAAGGGGGAGGAGGG	-135 a -174 (<i>Pbchs4</i>)
Competidor Mut1(TATA)	<i>senso</i>	CCCTCCTCCCCCCCCCTCCCTCGCCAGGGCTAAAGG	
	<i>anti-senso</i>	CCTTTAGCCCTGGCGAGGGGAGGGGGGGGAGGAGGG	
Competidor Mut2(STRE):	<i>senso</i>	CCCTCCTCCCCCTTTTTTGGGAAAAGCCAGGGCTAAAGG	
	<i>anti-senso</i>	CCTTTAGCCCTGGCTTTTCCCAAAAAGGGGGAGGAGGG	
Sonda <i>Pbchs4</i> (b)	<i>Senso</i> FAM	CTTTTCTTCCCTCCAGTTCAGTTGCT	
	<i>anti-senso</i>	AGCAACTGAACTGGAGGGAAGAAAAG	-456 a -481 (<i>Pbchs4</i>)
Competidor específico	<i>senso</i>	CTTTTCTTCCCTCCAGTTCAGTTGCT	
	<i>anti-senso</i>	AGCAACTGAACTGGAGGGAAGAAAAG	
Sonda 1 <i>H. grisea</i>	<i>senso</i> FAM	CCCTCAGCCCCACGGCTTTGGCCCCACGGCCCCCGCACGCACA	-172 a -215 (<i>HgPacC</i>)
	<i>anti-senso</i>	TGTGCGTGCGGGCCGTGGGGCCAAGACGCGTGGGGCTGAGGG	
Sonda 3 <i>H. grisea</i>	<i>senso</i> FAM	CCAAGAAGCTCTTGCCCTTGCGCGCCTTTG	-336 a -366 (<i>HgPacC</i>)
	<i>anti-senso</i>	CAAAGGCGCGCCAAGGCCAAGAGTTCTTGG	
Sonda 4 <i>H. grisea</i>	<i>senso</i> FAM	GCACCGGCCAAGTCTCCGTTTCTCCTCGACCGTCCCTGGCATTCCC	-403 a -449 (<i>HgPacC</i>)
	<i>anti-senso</i>	GGGAATGCCAAGGACGGTCGAGGAGAAACGGAGACTTGGCCGCTGC	

As sondas de *H. grisea* foram gentilmente cedidas por Thiago de Melo.

3.6.5 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

Eletroforese

A preparação do gel de poliacrilamida para os ensaios de retardo da mobilidade eletroforética foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Poliacrilamida 30,36%	7,500 mL
Glicerina 50%	7,500 mL
TEB 10X	1,125 mL
H ₂ O destilada	22,500 mL
Persulfato de amônio 25%	100,000 µL
TEMED	25,000 µL

Para montagem do gel e corrida eletroforética empregou-se o sistema *SE 600 Electroforesis Unit* (Amershan Biosciences). Após a polimerização do gel, a cuba foi preenchida com TEB 0,25X, os poços do gel lavados exaustivamente com esse tampão a fim de retirar resíduos de poliacrilamida não polimerizada, e realizou-se uma pré-corrída a 500 V durante 15 minutos. Visando manter a temperatura baixa durante a eletroforese, o sistema foi resfriado com auxílio de uma coluna de água fria, com dispositivo apropriado conectando uma fonte de água com a cuba de eletroforese. Posteriormente, as reações foram aplicadas no gel, aplicando-se azul de bromofenol em um poço para acompanhamento visual da corrida. A eletroforese procedeu a 500V até que o azul de bromofenol migrasse por aproximadamente 10 cm. Após a corrida eletroforética, o gel foi analisado no *scanner* Typhoon 9210 (Molecular Dynamics) de acordo com os seguintes parâmetros: filtro: fluoresceína 526SP, intensidade de 1000 V, sensibilidade: alta, *pixel size* de 200 microns e plano focal *plane*.

Anelamento

Sonda marcada

O oligonucleotídeo *sense* marcado com fluorescência e o oligonucleotídeo *anti-sense* foram diluídos em H₂O MilliQ na concentração final de 1µg/µL. A reação de anelamento das sondas foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Oligonucleotídeo <i>sense</i>	0,5 µL (0,5 µg)
Oligonucleotídeo <i>anti-sense</i>	0,5 µL (0,5 µg)
Tampão de Anelamento (Tris-HCl 1 M, pH 7,7)	6,0 µL
H ₂ O MilliQ	23,0 µL

Para os ensaios de competição específica ou com sondas mutadas, os oligonucleotídeos foram diluídos em H₂O MilliQ na concentração final de 5µg/µL. A reação de anelamento das sondas foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Competidores 25 X

Oligonucleotídeo <i>sense</i>	2,5 µL (12,5 µg)
Oligonucleotídeo <i>anti-sense</i>	2,5 µL (12,5 µg)
Tampão de Anelamento (Tris-HCl 1M, pH 7,7)	6,0 µL
H ₂ O MilliQ	19,0 µL

Competidores 50 X

Oligonucleotídeo <i>sense</i>	5,0 µL (25,0 µg)
Oligonucleotídeo <i>anti-sense</i>	5,0 µL (25,0 µg)
Tampão de Anelamento (Tris-HCl 1M, pH 7,7)	6,0 µL
H ₂ O MilliQ	14,0 µL

As reações de anelamento foram incubadas em água fervente por cinco minutos e mantidas no banho até que a temperatura diminuísse naturalmente, atingindo a temperatura ambiente.

Purificação da sonda marcada com fluorescência

A purificação da sonda marcada (após anelamento) foi realizada para remoção de contaminações com oligonucleotídeos de fita simples, autoanelados e produtos de degradação. Os 30 µL de oligonucleotídeos anelados foram divididos em 3 alíquotas, e aplicados no gel de poliacrilamida, conforme as condições descritas para a eletroforese dos ensaios de retardo da mobilidade eletroforética. Aplicou-se azul de bromofenol em um poço para acompanhamento visual da corrida. A corrida eletroforética procedeu-se até que o azul de bromofenol migrasse por aproximadamente 2/3 do gel, para que houvesse uma melhor separação da sonda anelada dos resíduos de contaminação,

Após a corrida, o gel foi marcado a cada 1 cm utilizando-se uma lâmina de bisturi e analisado em *scanner* Typhoon 9210 (Molecular Dynamics) de acordo com os seguintes parâmetros: filtro fluoresceína 526SP, intensidade de 1000 V, sensibilidade média, *pixel size* de 200 microns e plano focal *plane*. Com auxílio das marcações previamente realizadas, a

região correspondente à sonda anelada foi localizada, excisada do gel, transferida para um colchão de agarose 1%, e coberta com agarose fundida. Após a solidificação da agarose, foi feito um corte na agarose logo abaixo dos fragmentos de poliacrilamida e encaixou-se um fragmento de membrana DEAE celulose (Sartobind Membrane Adsorbers, Sartorius), utilizando agarose fundida para selar essa região perfurada. O gel foi coberto com TEB 0,5X. Para a migração da sonda da poliacrilamida para a membrana DEAE celulose, foi realizada uma eletroforese a 90 V por 80 minutos. Após a migração da sonda para a membrana, esta foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL, submersa em 250 μ L de solução de alta concentração de sal e incubada a 45°C durante 20 minutos. A solução contendo a sonda eluída foi transferida para novo tubo, repetindo-se a eluição com a mesma membrana e nova solução de alto sal. Os dois volumes foram agrupados e a sonda precipitada com 1 mL de etanol 100% gelado, com incubação a -20°C durante a noite. Seguiu-se uma centrifugação a 13.000 *g* por 30 minuto, lavagem com etanol 70% gelado e secagem ao ar. A sonda precipitada foi ressuspensa em 30 μ L de H₂O Milli Q. Para confirmação da purificação da sonda, 1 μ L foi aplicado no gel de poliacrilamida. Aplicou-se azul de bromofenol em um poço para acompanhamento visual da corrida. A eletroforese procedeu a 500V até que o azul de bromofenol migrasse por aproximadamente 10 cm. Após a corrida eletroforética, o gel foi analisado no *scanner* Typhoon 9210 (Molecular Dynamics) de acordo com os seguintes parâmetros: filtro: fluoresceína 526SP, intensidade de 600 V, sensibilidade: média, *pixel size* de 200 microns e plano focal *plane*.

Reação do EMSA

A reação foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Sonda anelada e purificada	1 μ L
KCl 1M	2 μ L
ZnCl ₂ 50 μ M	1 μ L
poli(dI-dC) 1 μ g/mL	1 μ L
Espermidina 80mM	1 μ L
H ₂ O Milli Q	4 μ L

Para reações utilizando competidores específicos ou sondas mutadas, foi realizada a mesma reação, adicionando-se 1 µL do competidor 25X ou 50X, ou 2 µL do competidor 50X para ensaio com competidor 100X, ajustando-se o volume de H₂O Milli Q.

Foram adicionados à mistura de reação o extrato protéico ou proteína recombinante, ajustando-se o valor final da reação para 20 µL. A reação foi incubada no gelo durante 10-15 minutos, e aplicou-se no gel de poliacrilamida para a corrida eletroforética, conforme as condições descritas.

Para os ensaios com extrato protéico, foram utilizados 1,8 µg de proteína. Além dos extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis* e da proteína recombinante PacCPb-GST, os ensaios de retardo da mobilidade eletroforética realizados neste trabalho também utilizaram a proteína recombinante CreAHg-GST, correspondente ao domínio de ligação ao DNA da proteína CreA de *H. grisea* fusionado à GST. A proteína recombinante CreAHg-GST foi gentilmente cedida por Thiago de Melo, membro do nosso grupo de pesquisa.

3.7 – Análise da Expressão do Gene 1,3-β-glicana sintase

A expressão do gene 1,3-β-glicana sintase foi investigada por meio da técnica de RT-PCR em tempo real. Analisamos os níveis de transcrito do gene *Pbfks1* a partir de RNA de *P. brasiliensis* cultivado nas formas de micélio e levedura. Avaliamos também os níveis de transcrito do gene *Pbfks1* a partir de RNA obtido de culturas de levedura crescidas em glicose 2% ou acetato de sódio 2% como fontes de carbono, por um período de 5 horas.

Os RNAs de *P. brasiliensis* obtidos de culturas crescidas nas diferentes fontes de carbono e os RNA da forma micelial foram gentilmente cedidos por Lorena Derengowski (Derengowski *et al.*, 2008), membro do nosso grupo de pesquisa. Para este trabalho, realizamos a extração de RNA de *P. brasiliensis* cultivado na forma de levedura, conforme descrito a seguir.

Extração de RNA (material RNase free)

As células da cultura de levedura de *P. brasiliensis* (item 3.3.3) foram coletadas em tubo do tipo *ependorf* (com capacidade para 1,5 mL) e centrifugadas a 2.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A mistura trizol-células foi transferida a um tubo do tipo *ependorf* (com capacidade para 2 mL) contendo micro-pérolas de vidro (SIGMA) cobrindo o fundo do tubo. A lise das células foi realizada por vigorosa agitação por 20 minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.000 g por 1 minuto para baixar as pérolas de vidro e os restos celulares, com o sobrenadante sendo transferido a um novo tubo *ependorf*. Ao lisado celular, adicionou-se 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa. Após centrifugação a 15.000 g por 30 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida a um novo tubo *ependorf*, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol. O material foi homogenizado e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 15.000 g por 15 min a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 75%, deixando-se secar à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuscitado em 50 µL de H₂O Milli Q.

Tratamento do RNA com DNase (material RNase free)

Os RNAs obtidos de culturas crescidas nas diferentes fontes de carbono (glicose e acetato) e os RNAs da forma micelial e leveduriforme de *P. brasiliensis* foram submetidos ao tratamento com DNase I livre de RNase (Invitrogen), a fim de eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico.

Após verificação da integridade dos RNAs por eletroforese em gel de agarose 0,8%, o material foi quantificado por espectrofotometria (Genequant, Amersham Pharmacia Biotech). As condições de tratamento com DNase I, para um volume final de 70 µL de reação, foram: 7 µg do RNA, tampão da DNase I 1X; 7 U da enzima DNase I. O tratamento foi realizado a 37°C por 30 minutos, parando-se a reação pela adição de 7 µL do tampão de inativação da enzima e aquecendo-a a 65°C por 10 minutos. Após precipitação padrão com etanol e acetato de sódio (Sambrook e Russel, 2001), o RNA total tratado com DNase I foi novamente analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificado. Uma última verificação,

para determinação de uma possível contaminação residual com DNA genômico, foi feita pela metodologia de PCR (item 3.5.8), utilizando o RNA como material genético da reação. Como controle positivo da reação foi empregado DNA genômico de *P. brasiliensis*.

Transcrição Reversa (material RNase free)

Após tratamento do RNA com DNase I, o cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total de cada amostra. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µg do iniciador OligodT18, ajustando-se o volume com H₂O Milli Q para 11,5 µL. A mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos, seguido de resfriamento imediato por incubação no gelo. À amostra foram adicionados 12,5 µL do MIX, contendo os seguintes reagentes em suas concentrações finais: tampão da transcriptase reversa 1X; DTT 200 mM; dNTPs 10 mM. Em seguida, a reação foi incubada a 42°C por 2 minutos, sendo adicionado ao sistema 200 U da enzima transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen) e incubando-se a 42°C por mais uma hora.

PCR em Tempo Real (material RNase free)

A reação de PCR foi preparada em um volume final de 10,0 µL, utilizando-se 0,2 µM de cada iniciador para amplificação do cDNA de 1,3-β-glicana sintase (tabela 5), 2,0 µL da diluição 1:8 do cDNA, e 5,0 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Para análise do controle interno, foram utilizados iniciadores que amplificam um fragmento do gene constitutivo *L34* de *P. brasiliensis* (tabela 5), que codifica a proteína ribossomal L34. As reações foram submetidas ao seguinte programa no termociclador: 1) 50°C/2 min; 2) 95°C/5 min; 3) 95°C/3 seg; 4) 60°C/30 seg; 5) Repetir passos 3 e 4 quarenta vezes. Todas as amplificações foram feitas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A análise da expressão do gene 1,3-β-glicana sintase foi realizada pelo método $\Delta\Delta C_t$.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR em Tempo Real – As sequências dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* para amplificação de um fragmento do gene *Pbfks1* e do controle interno são apresentadas.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Tm	Fragmento Amplificado (cDNA)
BGSYN_NF8 BGSYN_NR8	CCGCTCTGTATCCCGTATGT TTGATCAGTGACACCCCGTA	56,3°C 55,7°C	315 pb
5' L34 f 3' L34 r	CCGTACAACACACGGTCAAA GTGCGGTTCCCTTCTTCTTG	55,5°C 54,2°C	91 pb

A Tm (*melting temperature*) foi obtida pela ferramenta *Oligo Analyser*, disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. – Análise da Região Promotora do Gene quitina sintase 4 de *P. brasiliensis*

A quitina representa um dos principais componentes da parede celular de fungos, e sua síntese é regulada por uma família multigênica de quitina sintases. Em *P. brasiliensis*, foram identificados seis genes de quitina sintase (*Pbchs1*, *Pbchs2*, *Pbchs3*, *Pbchs4*, *Pbchs5* e *Pbchs6*) (San-Blas e Nino-Vega, 2008). Observa-se que nesse organismo os genes *Pbchs4* e *Pbchs5* apresentam a conformação *head-to-head*, conforme mostra a figura 8.

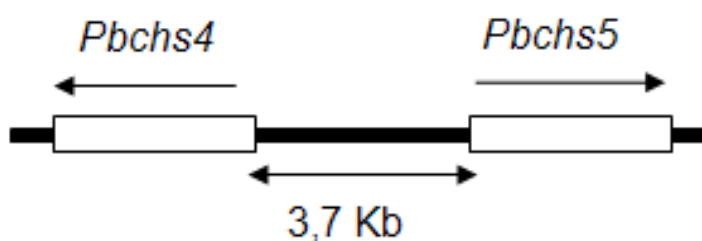


Figura 8. Conformação *head-to-head* dos genes *Pbchs4* e *Pbchs5* – Os sítios de iniciação da transcrição de *Pbchs4* e *Pbchs5* apresentam uma distância de aproximadamente 3,7 Kb.

Por apresentarem a conformação *head-to-head*, sugere-se que os genes *Pbchs4* e *Pbchs5* possam apresentar uma regulação transcricional em comum, conforme é proposto para os genes de quitina sintase *csmA* e *csmB* de *A. nidulans*, que apresentam essa conformação e são expressos nas mesmas condições osmóticas (Takeshita *et al.*, 2006). Portanto, foi realizada a análise computacional da região intergênica dos genes *Pbchs4* e *Pbchs5*. A figura 9 mostra os prováveis sítios de ligação para fatores de transcrição localizados na sequência nucleotídica entre esses dois genes.

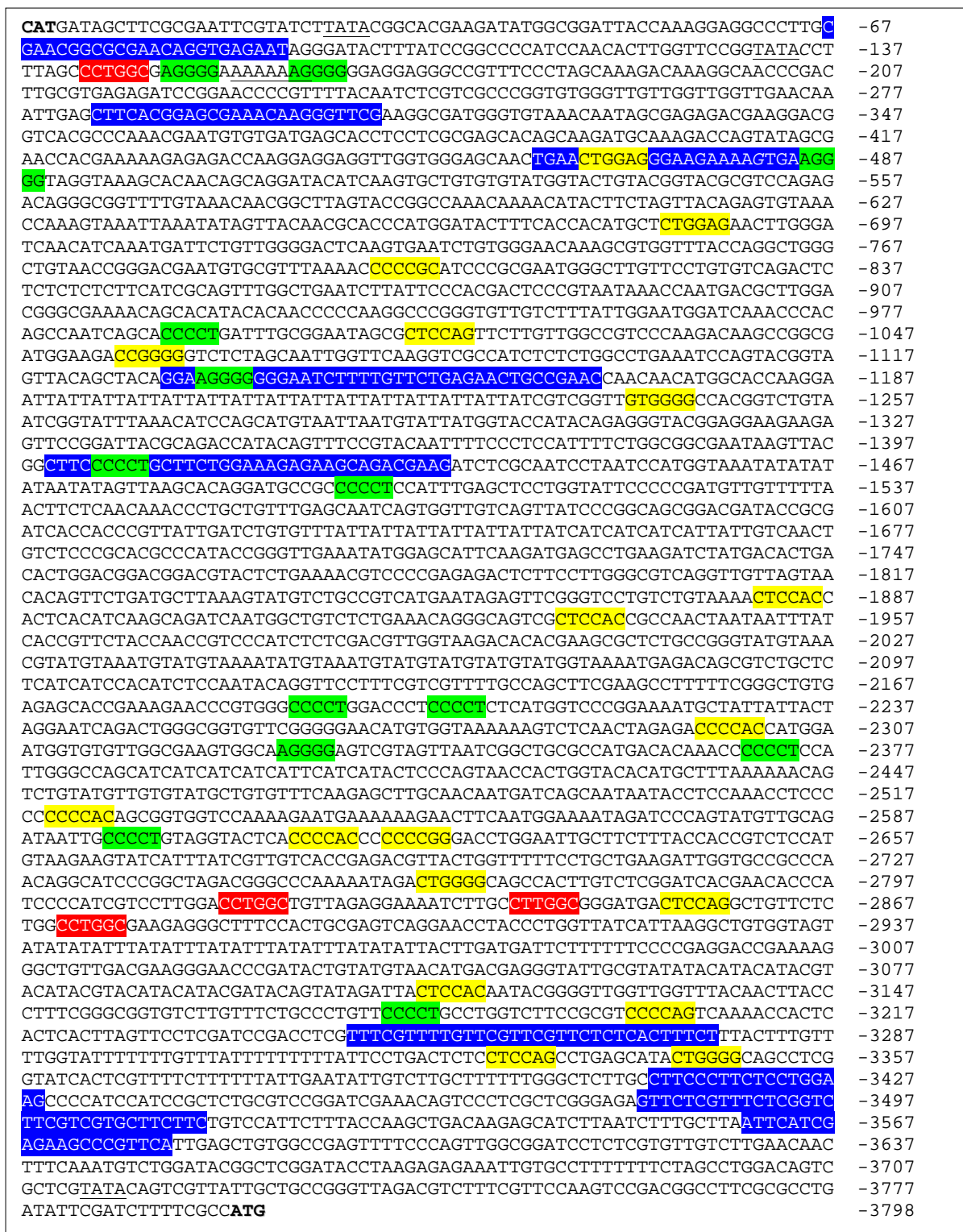


Figura 9. Sequência nucleotídica da região intergênica dos genes *Pbchs4* e *PbrCHS5* (número de acesso no GenBank EF654132) – Os sítios de iniciação da tradução estão em negrito (CAT: *Pbchs4*; ATG: *Pbchs5*). Os sítios putativos para o TATA Box estão sublinhados. Foram destacadas as seqüências consenso dos sítios para os fatores de transcrição PacC, em vermelho, CreA, em amarelo, em verde claro os elementos de resposta ao estresse (STRE) e em azul os elementos de resposta ao choque térmico (HSE).

Na região intergênica dos genes *Pbchs4* e *Pbchs5* foram encontrados quatro sítios para o fator de transcrição PacC, que regula a expressão gênica em resposta ao pH. Para o fator de transcrição CreA, que media a repressão gênica na presença de glicose, foram localizados 18 sítios. Foram identificados 13 elementos de resposta ao estresse (STRE) e nove elementos de resposta ao choque térmico (HSE).

4.1.1 – Produção da Proteína Recombinante PacCPb-GST para Análise do Promotor do Gene *Pbchs4*

Para investigar se o fator de transcrição PacC estaria atuando na regulação transcricional do gene *Pbchs4* produzimos a proteína recombinante PacCPb-GST, para sua posterior utilização em EMSA. Para realização dessa análise, foi realizada em *E. coli* a expressão do domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis* fusionado com a proteína glutationa S-transferase (GST). Em seguida, a proteína recombinante foi purificada utilizando-se uma coluna de GST-Sefarose. A utilização do domínio de ligação ao DNA de fatores de transcrição é amplamente empregada em ensaios de retardo da mobilidade eletroforética. Recentemente, Rauscher *et al.* (2006) utilizaram os domínios de ligação ao DNA das proteínas Ace1, Ace2, Hap2/3/5 e Xyr1 fusionados à GST para avaliar o envolvimento desses fatores na regulação da região promotora do gene que codifica a xilanase1 em *Trichoderma reesei*.

A figura 10 mostra o perfil do extrato protéico total de *E. coli* antes da purificação e as frações da proteína recombinante PacCPb-GST purificada. Observa-se uma banda entre os marcadores de 30 e 40 kDa correspondente à proteína recombinante PacCPb-GST, cujo tamanho esperado é de 39,2 kDa.

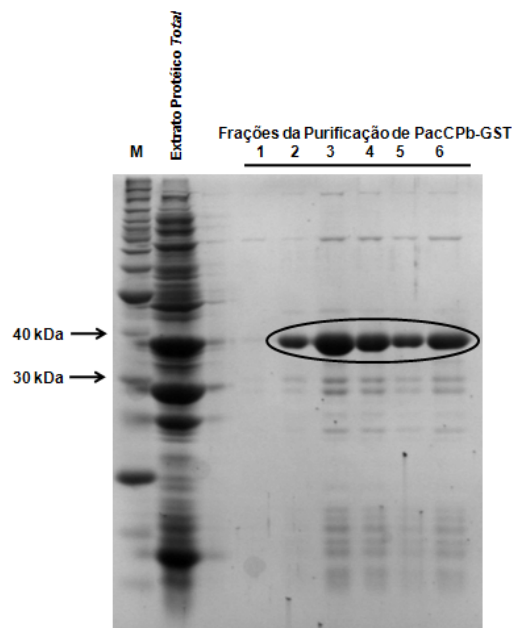


Figura 10. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12%) da proteína recombinante PacCPb-GST, corado com *Comassie Blue* – Extrato protéico total de *E. coli* após indução da expressão de PacCPb-GST. As frações de cromatografia em coluna de GST-Sefarose estão destacadas, indicando a proteína recombinante PacCPb-GST parcialmente purificada de 39,2 kDa (GST = 26 kDa; domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis* = 13,2 kDa). M: Marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). Foram aplicados 8 μ L de cada fração de cromatografia.

4.1.2 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda *Pbchs4(a)*

A figura 11 mostra uma seqüência da região promotora do gene quitina sintase 4 de *P. brasiliensis* utilizada como sonda em nossos experimentos, denominada sonda *Pbchs4(a)*. A sonda apresenta dois elementos de resposta ao estresse (STRE), um sítio para o fator regulatório PacC, e um TATA Box putativo.

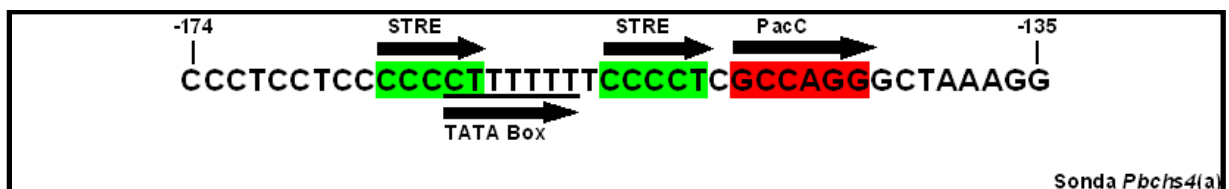


Figura 11. Sonda *Pbchs4(a)* – Seqüência do oligonucleotídeo *sensu* utilizado como sonda em EMSA. Em verde destacam-se os elementos de resposta ao estresse (STRE). Em vermelho destaca-se um sítio de ligação para o fator de transcrição PacC. O TATA Box putativo encontra-se sublinhado e foi identificado pela ferramenta TESS, disponível em <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, Sant'Ana (2008) demonstrou que a sonda *Pbchs4(a)* interage com extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Foi observada uma interação DNA-proteína específica nas fases de micélio e levedura e outra interação micélio específica (ver figura 3, página 12). Para investigar se o fator de transcrição PacC estaria atuando nessas interações, realizamos o ensaio de retardo da mobilidade eletroforética com a sonda *Pbchs4(a)* após incubação com a proteína recombinante PacCPb-GST. Entretanto, não foi observada a interação da sonda com o domínio de ligação ao DNA de PacC de *P. brasiliensis* (figura 12).

A



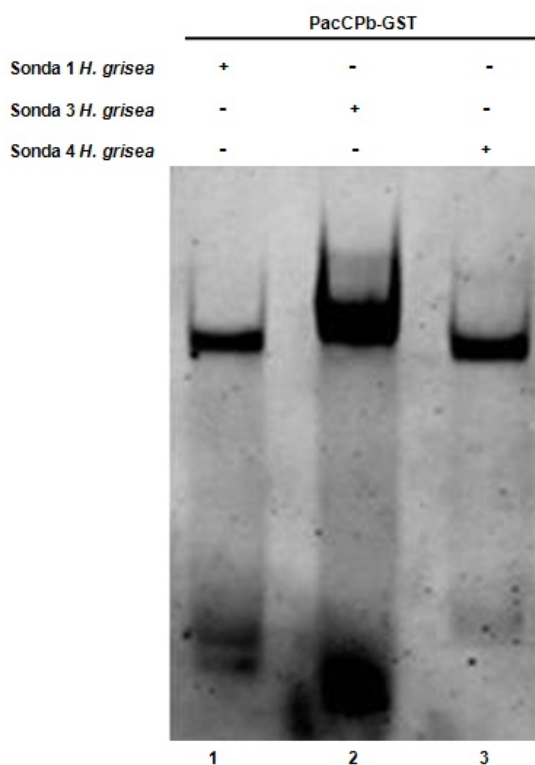
B

Sonda *Pbchs4(a)*: CCCTCCTCC**CCCT**TTTTTT**CCCT**CGCCAGGGCTAAAGG

Figura 12. Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando a sonda *Pbchs4(a)* com a proteína recombinante PacCPb-GST – (A) 1: sonda *Pbchs4(a)* livre; 2: sonda *Pbchs4* + PacCPb-GST. Foi utilizado 1,0 µg de proteína recombinante. (B) Sequência da sonda *Pbchs4(a)*, destacando em negrito os dois sítios para STRE(s) (CCCT) e o sítio para PacC (GCCAGG). Sublinhado encontra-se um putativo TATA Box.

O ensaio de retardo da mobilidade eletroforética utilizando a sonda *Pbchs4(a)* com a proteína recombinante PacCPb-GST foi repetido nas mesmas condições utilizadas no ensaio anterior e também testando 2,0 µg de PacCPb-GST, mas novamente não observamos nenhuma interação (dados não mostrados). Para avaliar a funcionalidade da proteína recombinante PacCPb-GST produzida neste trabalho, realizamos o ensaio de retardo da mobilidade eletroforética com sondas correspondentes ao promotor de PacC de *H. grisea* que contêm sítios para o fator de transcrição PacC. A figura 13 mostra o teste da funcionalidade de PacCPb-GST.

A



B

Sonda 1 *H. grisea*: CCCTCAGCCCCACGCGT**CTTGGC**CCCACGGCCCCGCACGCACA

Sonda 3 *H. grisea*: CCAAGAACT**CTTGCCCTTGCC**GCGCCTTTG

Sonda 4 *H. grisea*: GCACCG**GCCAAG**TCTCCGTTTCTCCTCGACCGTC**CTTGGC**ATTCCC

Figura 13. Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética para teste da funcionalidade da proteína recombinante PacCPb-GST – (A) 1: sonda 1 de *H. grisea* + PacCPb-GST; 2: sonda 3 de *H. grisea* + PacCPb-GST; 3: sonda 4 de *H. grisea* + PacCPb-GST. Foram utilizados 2,0 µg de proteína recombinante. (B) Sequências das sondas de *H. grisea*, destacando em negrito os sítios para PacC.

As sondas de *H. grisea* testadas com PacCPb-GST são consideradas funcionais por interagirem com o domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *H. grisea* (dados do nosso grupo de pesquisa). Conforme observamos na figura 13, as sondas 1, 3 e 4 de *H. grisea* interagem também com a proteína recombinante PacCPb-GST. Esses resultados comprovam a funcionalidade da proteína recombinante PacCPb-GST, sugerindo que o sítio para o fator de transcrição PacC identificado na sonda *Pbchs4(a)* não é funcional.

O fator de transcrição PacC regula a expressão de genes em resposta ao pH. Em *A. nidulas*, em pH alcalino e neutro, PacC ativa genes requeridos para essa condição, incluindo sua própria expressão, e reprime genes expressos em condições ácidas (Tilburn *et al.*, 1995). A sua ativação ocorre em pH alcalino a neutro e requer duas clivagens proteolíticas (Diez *et al.*, 2002), mas esse processamento não é requerido para a ligação ao DNA, embora determine a localização nuclear do fator de transcrição *in vivo* (Orejas *et al.*, 1995). Observa-se que em *C. albicans*, o gene *PHR2*, homólogo de *PHR1* nesse organismo e que codifica uma β -glicosidase da parede celular, é expresso preferencialmente em pH ácido, regulação oposta ao observado para *PHR1*, e reprimido em pH alcalino de forma dependente de Rim101p, homólogo de PacC em *C. albicans* (Muhlschlegel e Fonzi, 1997). Aguiar (2006) demonstrou que em *P. brasiliensis* o gene que codifica PacC é expresso tanto em condições alcalinas como ácidas, sugerindo que sua regulação ocorre em nível pós-transcricional.

Em *A. nidulans*, o sítio de ligação para PacC é dado pela sequência consenso GCCARG, onde R pode ser “A” ou “G”. Qualquer substituição de base resulta em uma substancial ou completa perda de ligação (Espeso *et al.*, 1997). Ao compararmos as sondas de *H. grisea* com a sonda *Pbchs4(a)*, observamos que todas as sondas de *H. grisea* apresentam “A” na posição cinco, enquanto que na sonda *Pbchs4(a)* essa posição é constituída por “G” (figura 14).

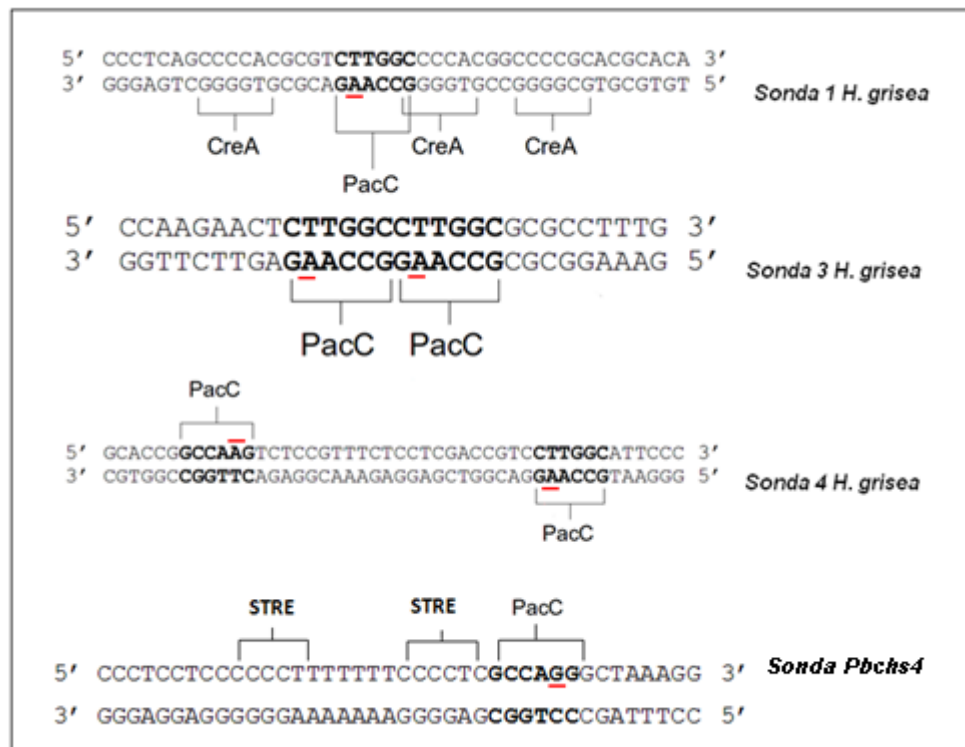


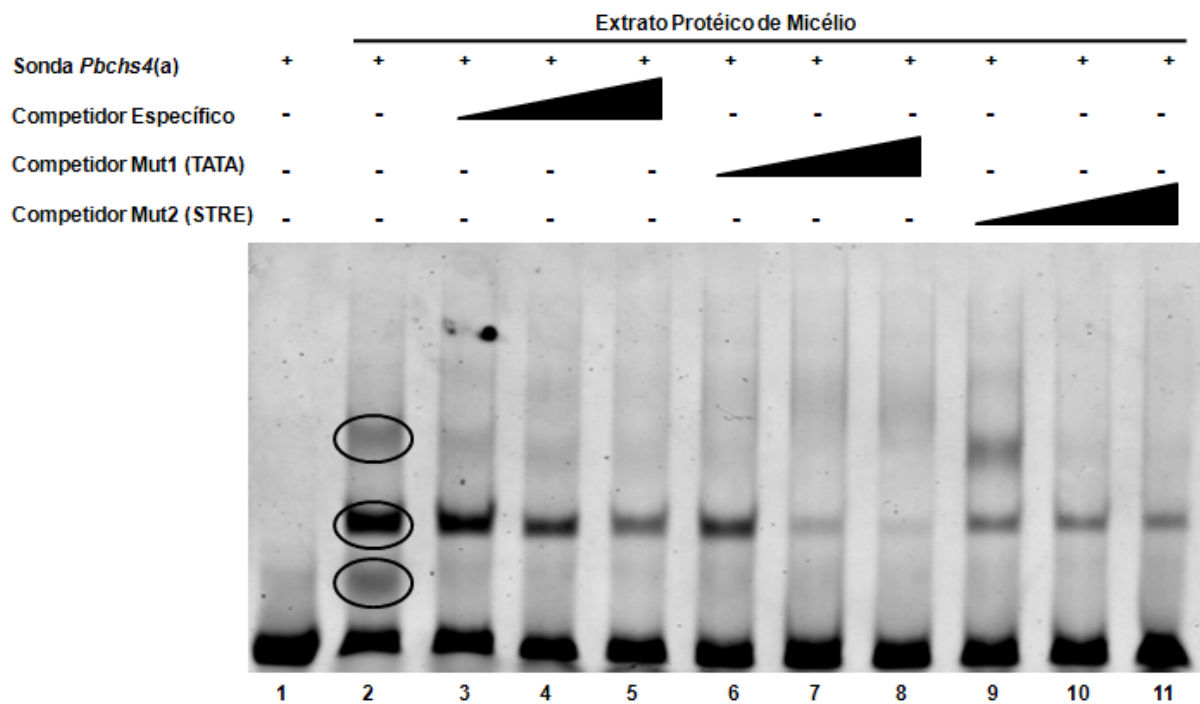
Figura 14. Comparação dos sítios de ligação para PacC presentes nas sondas 1, 3 e 4 de *H. grisea* e na sonda *Pbchs4(a)* – A seqüência do sítio de ligação para PacC está em negrito, com a base na posição 5 grifada em vermelho.

Apesar da substituição de “A” por “G” na quinta posição ser descrita como tolerada em *A. nidulans*, nossos resultados revelaram que o domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição PacC de *P. brasiliensis* não interage com o sítio presente na sonda *Pbchs4(a)*, que apresenta “G” na posição cinco. Entretanto, esta proteína recombinante é capaz de reconhecer sondas de *H. grisea* que apresentam o sítio GCCAAG, que contém “A” nessa posição. Baek *et al.* (2006) sugerem que, em *C. albicans*, Rim101p se liga ao sítio GCCAAGAA, seqüência que engloba o sítio GCCAAG reconhecido por PacC de *P. brasiliensis* neste trabalho, mas também sugere que pequenas divergências são toleradas. Ramón e Fonzi (2003) relataram que no promotor de *PHR1* de *C. albicans* o sítio não requer “G” na primeira posição e Rim101p reconhece a seqüência CCAAGAA. Entretanto, para o promotor *PHR2* de *C. albicans*, um sítio requer “G” na primeira posição e em outro sítio Rim101p também é capaz de reconhecer apenas a seqüência CCAAGAA (Baek *et al.*,2006).

Na região intergênica de *Pbchs4* e *Pbchs5*, foram localizados quatro sítios para o fator de transcrição PacC de acordo com a seqüência consenso descrita para *A. nidulans*. Desses, três apresentam “G” na posição cinco e um apresenta “A” nessa posição. Embora o sítio para PacC analisado no promotor de *Pbchs4* não seja funcional, consideramos que o seu papel na regulação dos genes de quitina sintase requer investigação. Para sobreviver e proliferar, os microrganismos precisam se adaptar a mudanças no pH ambiental. O pH do ambiente afeta profundamente a biologia do fungo, influenciando o metabolismo, o desenvolvimento morfológico e a virulência de patógenos. Essas respostas derivam, em parte, da alteração da expressão de genes, e muitos desses genes codificam proteínas secretadas ou da superfície celular, que estão diretamente expostas ao ambiente (Denison, 2000).

Sant’Ana (2008) demonstrou que a sonda *Pbchs4(a)* apresenta retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Os nossos ensaios com a proteína recombinante PacCPb-GST revelaram que essa interação não ocorre no sítio de ligação para PacC presente nessa sonda. Visto que a sonda *Pbchs4(a)* também apresenta elementos de resposta ao estresse, sugerimos que esses elementos possam estar envolvidos na regulação do gene quitina sintase 4 de *P. brasiliensis*. A definição dos sítios na seqüência promotora onde os fatores de transcrição se ligam são pré-requisitos essenciais para a compreensão de como essas proteínas modulam a expressão do gene (Read *et al.*, 2009). Mutações e deleções podem ser introduzidas nas sondas para verificar quais sítios são importantes para estabelecer a interação DNA-proteína. Nessa perspectiva, a partir da sonda *Pbchs4(a)* produzimos duas sondas mutadas a fim de anular um sítio em STRE e o putativo TATA Box. Realizamos o ensaio de retardo da mobilidade eletroforética com a sonda *Pbchs4(a)* e extrato protéico de micélio, utilizando como competidores a sonda mutada ou em STRE ou a sonda mutada no putativo TATA Box (figura15).

A



B

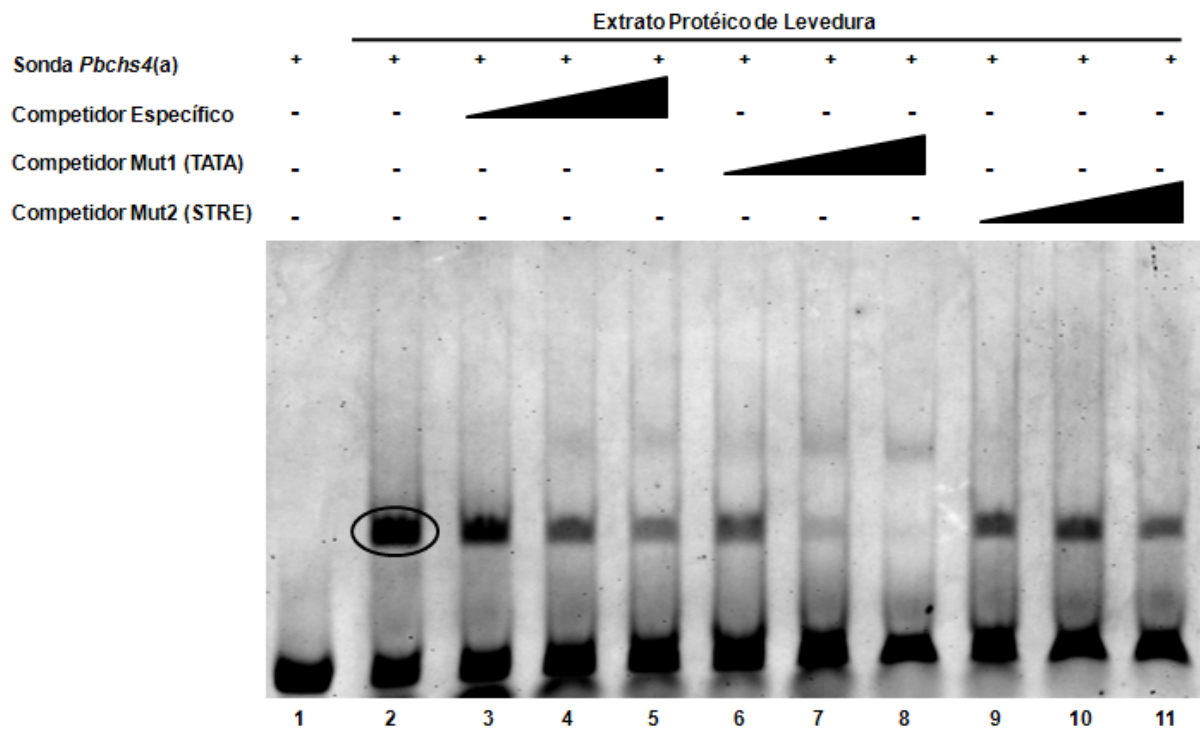
Sonda *Pbchs4(a)*: CCCTCCTCC**CCCT**TTTTTTT**CCCCTCGCCAGG**GCTAAAGG
 Competidor Mut1(TATA): CCCTCCTCCCCCCCCCCCTCCCCCTCGCCAGGCTAAAGG
 Competidor Mut2(STRE): CCCTCCTCCCCCCTTTTTTGGGAAAGCCAGGCTAAAGG

Figura 15. Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando as sondas *Pbchs4(a)* mutadas e extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* – (A) 1: sonda *Pbchs4(a)* livre; 2: sonda *Pbchs4(a)* + extrato de micélio; 3, 4 e 5: sonda *Pbchs4(a)* + extrato de micélio + competidor específico 25X, 50X e 100X, respectivamente; 6, 7 e 8: sonda *Pbchs4(a)* + extrato de micélio + competidor Mut1(TATA) 25X, 50X e 100X, respectivamente; 9, 10 e 11: sonda *Pbchs4(a)* + extrato de micélio + competidor Mut2(STRE) 25X, 50X e 100X, respectivamente. (B) Seqüência da sonda *Pbchs4(a)*, destacando em negrito os dois sítios para STRE (CCCT) e o sítio para PacC (GCCAGG), e sublinhado encontra-se um putativo TATA Box. Nas sondas *Pbchs4(a)* mutadas, os sítios modificados encontram-se em duplo sublinhado.

Conforme observamos na figura 15, a sonda *Pbchs4(a)* apresenta três retardos da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato de micélio (poço 2). O complexo de menor massa molecular não havia sido detectado nos ensaios de Sant'Ana (2008). Essa é uma interação específica, visto que é abolida nas reações com os competidores específicos, e parece não estar associada aos sítios de STRE e TATA Box. O complexo de maior massa molecular também é específico e abolido pelos competidores, e parece não estar relacionado aos sítios de STRE e TATA Box. O complexo intermediário é gradativamente abolido na presença dos competidores específicos (poços 3, 4 e 5), devido à competição no ensaio. Observa-se também que quando o competidor em que o putativo TATA Box encontra-se modificado (poços 6, 7 e 8), o complexo intermediário também é reduzido, demonstrando que essa sonda funciona como competidor da interação. Esse resultado revela que essa interação não está associada ao TATA Box, já que mesmo com a mutação nesse sítio, a sonda é capaz de competir pelo fator que está provocando o retardo. Essa mesma interação não é abolida na presença do competidor em que STRE está modificado (poços 9, 10 e 11), demonstrando que a mutação não está atuando como competidor, e que portanto o sítio de STRE continua ocupado na sonda selvagem. Esse resultado sugere que a interação está ocorrendo no elemento de resposta ao estresse.

Posteriormente, realizamos o ensaio de retardo da mobilidade eletroforética com a sonda *Pbchs4(a)* e extrato protéico de levedura, também utilizando como competidores a sonda mutada ou em STRE ou a sonda mutada no putativo TATA Box (figura 16).

A



B

Sonda *Pbchs4(a)*: CCCTCCTCC**CCCT**TTTTTTT**CCCT**GCCAGGGCTAAAGG
 Competidor Mut1(TATA): CCCTCCTCCCCCCCCCCCTCCCCCTGCCAGGGCTAAAGG
 Competidor Mut2(STRE): CCCTCCTCCCCCTTTTTTGGGAAAAGCCAGGGCTAAAGG

Figura 16. Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando as sondas *Pbchs4(a)* mutadas e extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* – (A) 1: sonda *Pbchs4(a)* livre; 2: sonda *Pbchs4(a)* + extrato de levedura; 3, 4 e 5: sonda *Pbchs4(a)* + extrato de levedura + competidor específico 25X, 50X e 100X, respectivamente; 6, 7 e 8: sonda *Pbchs4(a)* + extrato de levedura + competidor Mut1(TATA) 25X, 50X e 100X, respectivamente; 9, 10 e 11: sonda *Pbchs4(a)* + extrato de levedura + competidor Mut2(STRE) 25X, 50X e 100X, respectivamente. (B) Sequência da sonda *Pbchs4(a)*, destacando em negrito os dois sítios para STRE (CCCT) e o sítio para PacC (GCCAGG), e sublinhado encontra-se um putativo TATA Box. Nas sondas *Pbchs4(a)* mutadas, os sítios modificados encontram-se em duplo sublinhado.

Conforme observamos na figura 16, a sonda *Pbchs4(a)* apresenta um retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato de levedura (poço 2). Essa interação é específica e corresponde ao complexo intermediário observado no ensaio com extrato de micélio (figura 16, poço 2). Assim como no ensaio com extrato de micélio, no ensaio com extrato de levedura o complexo também é gradativamente abolido na presença do competidor em que o putativo TATA Box encontra-se modificado (poços 6, 7 e 8). Visto que mesmo com a modificação essa sonda atua como competidor, esse resultado novamente revela que essa interação não está associada ao sítio TATA Box. Nesse ensaio com extrato de levedura, a interação também não é abolida na presença do competidor em que STRE está modificado (poços 9, 10 e 11), indicando que a modificação desse sítio anula a competição. Esse resultado novamente sugere que a interação está ocorrendo em STRE.

Observamos que a sonda *Pbchs4(a)* apresenta duas interações micélio específicas, e uma interação específica comum entre as fases de micélio e levedura. Demonstramos que essa interação está relacionada ao STRE. Freitas e Bertolini (2004) produziram sondas mutadas em que o sítio STRE do promotor de um gene de *N. crassa* foi alterado de CCCCT para AAAAG, impedindo a formação do complexo DNA-proteína em EMSA. Em nosso trabalho modificamos o sítio STRE e os dois nucleotídeos adjacentes, alterando a seqüência TCCCCTC para GGGAAAA, e observamos que essa alteração impede a formação da interação e a sonda mutada não atua como competidor. Esses resultados indicam que esse sítio está envolvido na interação observada na fase de micélio e levedura. O elemento de resposta ao estresse foi identificado no promotor de genes que respondem a uma ampla variedade de sinais de estresse, tais como estresse nutricional, térmico, osmótico e oxidativo (Mager e Kuifjiff, 1995). Em *S. cerevisiae*, o elemento de resposta ao estresse é regulado pelas proteínas Msn2p e Msn4p. Martinez-Pastor *et al.* (1996) realizaram mutações nos genes *MSN2* e *MSN4* de *S. cerevisiae*, e demonstraram que duplo-mutantes apresentaram um aumento da sensibilidade a condições severas de estresse. Além disso, o grupo demonstrou por meio de EMSA que o domínio de ligação ao DNA das proteínas Msn2p e Msn4p se liga aos sítios de STRE no promotor de *HSP12*. Schuller *et al.* (1994) observaram ainda que a indução por estresse osmótico do gene *CTT1* de *S. cerevisiae*, que codifica uma catalase citosólica, é mediada por STRE e regulada pela via HOG MAP quinase. Consideramos que a investigação do papel funcional de STRE na regulação do gene *Pbchs4* poderá fornecer dados para uma maior compreensão da regulação da biossíntese e manutenção da parede celular.

4.1.3 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda *Pbchs4(b)*

A figura 17 mostra uma seqüência de uma outra região do promotor do gene quitina sintase 4 de *P. brasiliensis* utilizada como sonda em nossos experimentos, denominada sonda *Pbchs4(b)*. A sonda apresenta um sítio para o fator regulatório CreA, que reprime a expressão gênica na presença de glicose.

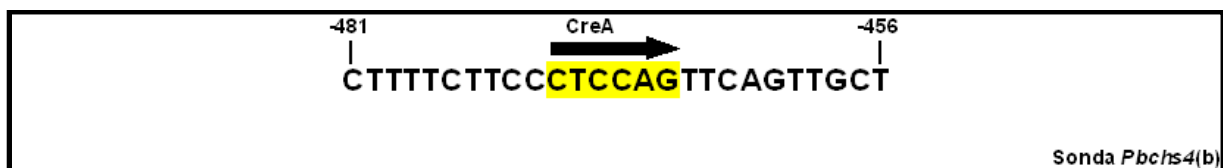
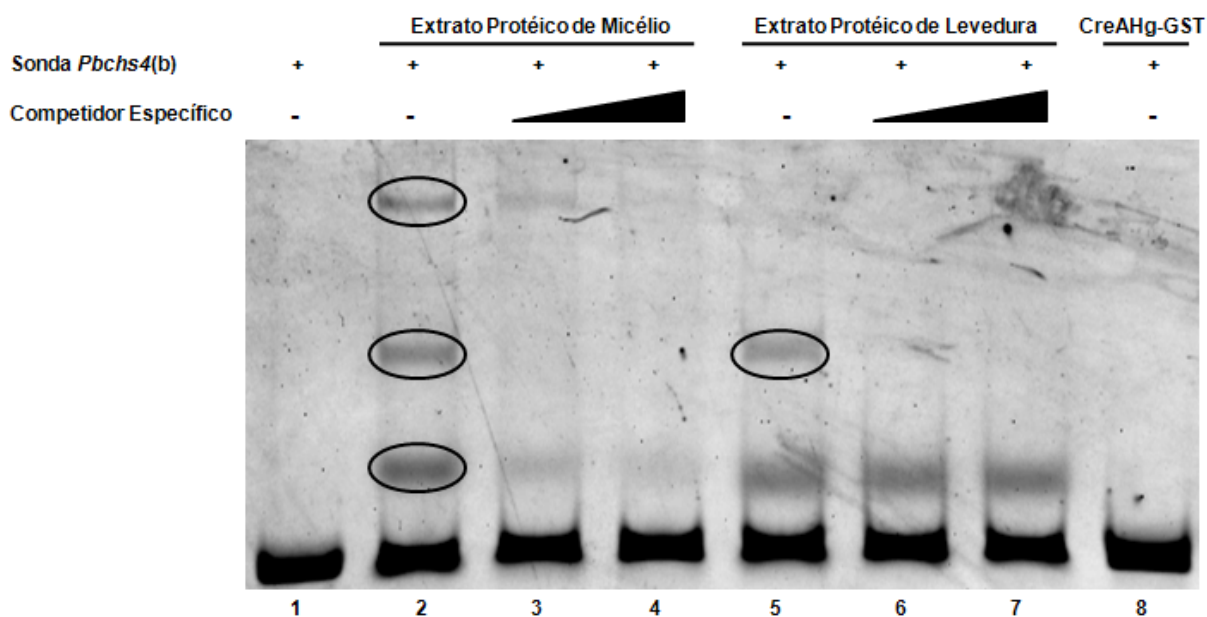


Figura 17. Sonda *Pbchs4(b)* – Seqüência do oligonucleotídeo *sense* utilizado como sonda em EMSA. Em amarelo destaca-se o sítio de ligação para o fator de transcrição CreA.

Avaliamos se a sonda *Pbchs4(b)* interage com a proteína recombinante CreAHg-GST, correspondente ao domínio de ligação ao DNA da proteína CreA de *H. grisea* fusionada com GST. Neste ensaio também avaliamos se os fatores de transcrição presentes nos extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis* interagem com a sonda *Pbchs4(a)*, conforme mostrado na figura 18.

A



B

Sonda *Pbchs4(b)*: CTTTTCTTCC**CTCCAG**TTTCAGTTGCT

Figura 18. Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando a sonda *Pbchs4(b)* com extratos protéicos de micélio ou levedura de *P. brasiliensis*, ou a proteína recombinante CreAHg-GST– (A) 1: sonda *Pbchs4(b)* livre; 2: sonda *Pbchs4(b)* + extrato de micélio; 3 e 4: sonda *Pbchs4(b)* + extrato de micélio + competidor específico 25X e 50X, respectivamente; 5: sonda *Pbchs4(b)* + extrato de levedura; 6 e 7: sonda *Pbchs4(b)* + extrato de levedura + competidor específico 25X e 50X, respectivamente; 8: sonda *Pbchs4(b)* + CreAHg-GST. Foi utilizado 1,0 µg de proteína recombinante. (B) Seqüência da sonda *Pbchs4(b)*. Em negrito destaca-se o sítio para CreA.

Conforme mostra a figura 18, a sonda *Pbchs4(b)* apresenta três retardos da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato de micélio (poço2), e verificamos que essas interações são específicas visto que na presença de concentrações crescentes do competidor específico a formação desses complexos com a sonda marcada com fluorescência é reduzida (poços 3 e 4). Observamos uma interação específica da sonda *Pbchs4(b)* quando incubada com extrato de levedura, pois ela também é diminuída na presença de competidores específicos (poços 6 e 7). Entretanto, sugerimos que essa interação não ocorre no sítio para CreA, visto que a sonda *Pbchs4(b)* não interage com a proteína recombinante CreAHg-GST (poço 8). O fator de transcrição CreA reconhece a seqüência consenso SYGGRG (S=C ou G, Y=C ou T e R=A ou G), embora nem todas as possibilidades derivadas a partir dessa

seqüência consenso funcionem como sítio de ligação e alguns sítios sejam contexto-dependentes (Cubero e Scazzocchio, 1994). Ensaios demonstraram que CreA de *A. nidulans* pode reconhecer seqüências compostas por 6 nucleotídeos divergentes da seqüência consenso, porém, a ligação a esses sítios atípicos está relacionada à proximidade de um segundo sítio para CreA, o que estabilizaria o complexo DNA-proteína (Espeso e Penalva, 1994). Em nosso trabalho, observamos que o domínio de ligação ao DNA de *H. grisea* não reconheceu o sítio CTCCAG no promotor do gene *Pbchs4*. Ressaltamos que CreAHg-GST é considerada funcional (dados do nosso grupo de pesquisa), mas devemos considerar a hipótese de que CreA de *H. grisea* e CreA de *P. brasiliensis* podem apresentar afinidades de ligação distintas. Entretanto, análises genéticas indicam que esse mecanismo regulatório é altamente conservado entre os fungos. Vautard *et al.* (1999) relataram que o fator de transcrição CRE1 de *Sclerotinia sclerotiorum* apresenta 59% de similaridade e complementa funcionalmente CreA de *A. nidulans*.

Os resultados de EMSA sugerem que o sítio para CreA da sonda *Pbchs4(b)* não é funcional e, portanto, não demonstram o envolvimento do fator de transcrição CreA nas interações obtidas entre a sonda *Pbchs4(b)* e os extratos de proteína de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Todavia, consideramos que a utilização do domínio de ligação ao DNA da proteína CreA de *P. brasiliensis* nos ensaios contribuirá para a análise dessa investigação. A proteína CreA é relacionada à proteína Mig1p, o fator de transcrição que media a repressão por glicose em genes de *S. cerevisiae*, e é necessária para a total repressão de genes de *A. nidulans* envolvidos na via de utilização de etanol (Panozzo *et al.*, 1998). Em *A. nidulans*, quando o fungo é crescido em glicose, o gene *creA* é ativamente transcrito e traduzido. Essa proteína repressora, ao se ligar na seqüência promotora, atua como competidor pelos sítios de fatores de transcrição ativadores (revisto por Poças-Fonseca, 2000). Ensaios de gene repórter revelaram que a atividade do gene *lacZ* controlada pelo promotor do gene quitina sintase 4 é reprimida na presença de glicose (Sant'Ana, 2008). Portanto, visto que identificamos na região intergênica de *Pbchs4* e *Pbchs5* 18 sítios potenciais para o fator de transcrição CreA, consideramos que o papel de CreA na regulação do gene quitina sintase 4 requer investigação adicional.

4.2 – Análise da Região Promotora do Gene 1,3-β-glicana sintase de *P. brasiliensis*

A 1,3-β-glicana representa um dos principais componentes da parede celular de fungos, e sua síntese é regulada pela enzima 1,3-β-glicana sintase. Em *P. brasiliensis*, foi caracterizado um gene que codifica uma 1,3-β-glicana sintase (Pereira *et. al.*, 2000), denominado *Pbfks1*. A análise da região promotora do gene *Pbfks1* revelou sítios de ligação putativos para fatores de transcrição, destacados na figura 19:

```
-1235 GTCCGGTTGCATGCAGCCACCCCAGCTGTATAGGGCCCAGCCACGGCAGAAAACATCGGCCATACCTGTTTAA
-1163 TTTACCTGAAAAGTTACGTACTTCGGGAAATACCTGGAATACCTGTGAATAATACCTCCCGTGCCTGAGCCCAT
-1091 TATTGGCTGATTCTGTCAATCCCTTACTTGGTATAATGTTCTGTCTGGTTGTTCTTGTGTATGTCAGTTTTG
-1019 TTGCAGATGTTTCTTTTTTTTCACTTCCCGCGTCCCTCTCTCTCTCCTCCTCCTCCTTTTCGCCTTCGCTGCG
-947 ACCACCAACTTTTATTTTATTTATGTTTCTTGACCACACTCTCTTTTTTGTCTTCCTTTTCGGTTTTGTCTCT
-875 CTCCCTCTCTCTCTGTTTACCTTTCTCACTCGTTCAACGGGTAACCAGGAGGGTTCGTGAGAGCCAAGCAGCC
-803 CTGACACATTCTAATACCGGAGTGCCACGCTTGGCAGATCATTTTGCCTGTGCCGCCTCCTGTCGTTGCTGT
-731 TGCTGCTGCGACCGTACCTTCCTCGTCTGAGGCCTGCACATATGGCTGCGTAACCACAACCTTCACTCGTTTTC
-659 ACAACAAATAATAATATCGAAAGGGGATACAAACGTCTTCTTCTTTTCGTCTTCTTGTTTATCCTTCTTCCCTC
-587 CTCTCTCTCTCTCTCTCCCTCCCTCCCAATCCCGTATCTTGTGCTGCATTCTTTGCATCATCAATCGCTTG
-515 TTAGGTCCCACCCCCTGGAACCGTTGTCCCTTTTACCTGGCGTGTTGACCACCACCCCTTCCTCTCACAT
-443 CACTCTCTCGAATCGGTTTTCGACCGTCAACTCTCTTATCCGGTTTCCAATTACGAGCTACACCTCTCTCC
-371 TATATAGCCCGTCGAAGGAAGAGAGAAATAAAAGCAGGAAATCCTCGCGGTCTCATCTTTGTGTGCGTTG
-299 CGTTGCTCTTGCTGTTTGCTTTCGCTGGCTTTGTTTACTTTCGTTTGACAATCGATTTGCGAGTACAC
-227 CACGACCGTTAACTACCAGGAATATCTTTCTTTTGTCTTTTTCTGTGACGGATTTTCCTTGCTTTTTTGACAT
-155 CAGAGTTAATGGGTATGATAATATTATAACGTAAGCTTTCTTCTTGTGCTTGGGAGGGATTTCGATTAGCTGATT
-83 GCGTGGTTGGAAATTCAAATTGGCTGACCAAGTTGCATCTATTGCCGCCCTACAGTCGAGAAATTTGAATTG
-11 TCCGTTTAACCATG
```

Figura 19. Sequência nucleotídica da região promotora do gene *Pbfks1* (número de acesso no GenBank AF148715) – O sítio de iniciação da tradução está em negrito. Os sítios putativos para o TATA Box estão sublinhados. Foram destacadas as seqüências consenso dos sítios putativos para os fatores de transcrição PacC, em vermelho, CreA, em amarelo, FacB, em verde escuro, em verde claro os elementos de resposta ao estresse (STRE) e em azul os elementos de resposta ao choque térmico (HSE).

Na região promotora do gene *Pbfks1* foram encontrados três sítios para o fator de transcrição PacC, que regula a expressão de genes em resposta ao pH. Também foram identificados dois sítios para o fator de transcrição CreA, que reprime a expressão gênica na presença de glicose, e quatro sítios para o fator de transcrição FacB, requerido para crescimento em meio com fonte de dois carbonos, como acetato. Localizamos também três elementos de resposta ao estresse (STRE) e quatro elementos de resposta ao choque térmico (HSE).

4.2.1 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda *Pbfks1(a)*

A figura 20 mostra a seqüência de uma região do promotor do gene 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis* utilizada como sonda em nossos experimentos, denominada sonda *Pbfks1(a)*. A sonda apresenta um elemento de resposta ao choque térmico (HSE) e um putativo TATA Box.



Figura 20. Sonda *Pbfks1(a)* – Seqüência do oligonucleotídeo *sensu* utilizado como sonda em EMSA. Em azul destaca-se o elemento de resposta ao choque térmico. O putativo TATA Box encontra-se sublinhado.

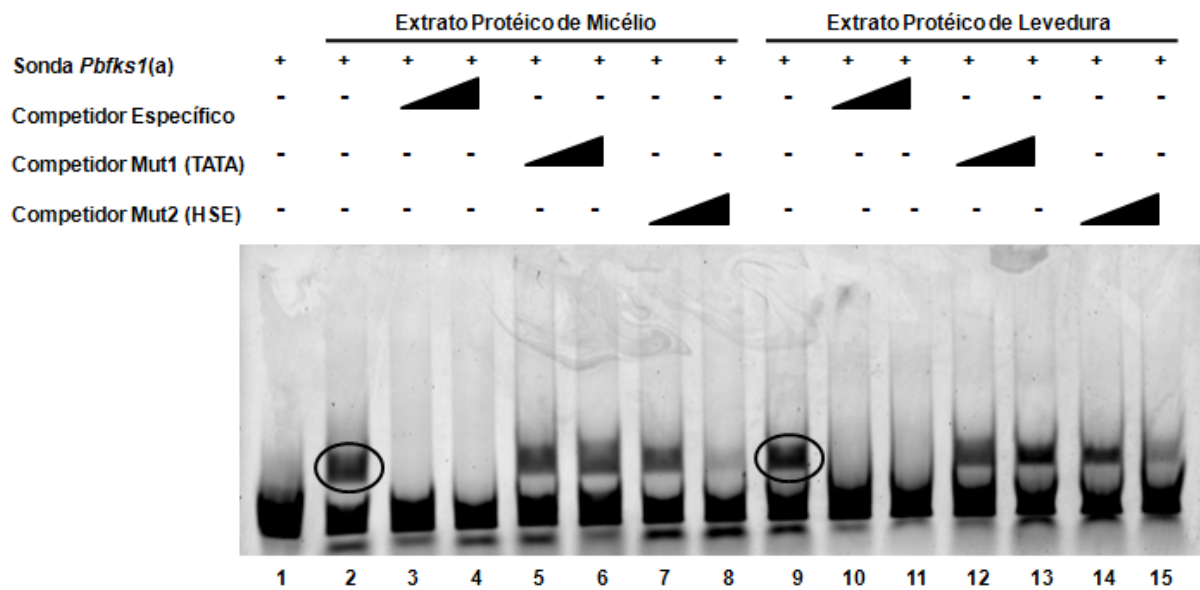
Em *S. cerevisiae*, a síntese de 1,3- β -glicana é realizada pelos produtos de dois genes homólogos, *FKS1* e *FKS2*. Foi observado que o mRNA de *FKS2* de *S. cerevisiae* aumenta quando a temperatura é alterada de 23°C para 39°C (Zhao *et al.*, 1998). Ishihara *et al.* (2007) realizaram construções moleculares para expressar Fks1p e Fks2p sob a regulação do promotor de *FKS1* ou do promotor de *FKS2* em linhagens mutantes *fks1/fks2*. Após a exposição à temperatura de 55°C, foi verificada a viabilidade dos esporos. As linhagens que expressaram Fks1p e Fks2p sob a regulação do promotor *FKS2* apresentaram sensibilidade térmica similar às linhagens selvagens, enquanto que as linhagens onde as proteínas foram expressas sob a regulação do promotor *FKS1* apresentaram sensibilidade semelhante aos mutantes não transformados. Esses resultados mostram que o promotor de *FKS2* parece responder ao choque térmico, visto que direcionou a expressão de 1-3- β -glicana sintase em resposta ao aumento de temperatura. No promotor de *FKS2* de *S. cerevisiae* não há HSE dentro de uma seqüência de pelo menos 1 kb a montante do sítio de iniciação da tradução (Zhao *et al.*, 1998). É proposto por Kim *et al.* (2008) que a atividade transcricional de *FKS2* em *S. cerevisiae* requer a formação de um complexo entre Mpk1, componente da cascata MAP quinase, e Swi4/Swi6, dois componentes do fator transcricional SBF.

A análise com a ferramenta TESS não localizou sítios para *Swi4/Swi6* no promotor do gene *Pbfks1*, mas nossa análise revelou a presença de quatro elementos de resposta ao choque

térmico. Yamamoto *et al.* (2005) relataram que em *S. cerevisiae* a proteína HSF, fator de transcrição de resposta ao choque térmico, é necessária para a resposta ao choque térmico induzindo não apenas a transcrição de HSPs, mas também de genes que codificam proteínas envolvidas em uma diversidade de processos celulares, tais como degradação, geração de energia, metabolismo de carboidratos e manutenção da integridade da parede celular. Para investigar o papel de HSE na regulação do promotor do gene 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis*, selecionamos a seqüência correspondente à sonda *PbfksI(a)* que contém um elemento de resposta ao choque térmico para realização do ensaio de retardo da mobilidade eletroforética.

Realizamos o EMSA com a sonda *PbfksI(a)* e extratos protéicos de micélio e levedura, utilizando como competidores a sonda mutada ou em HSE ou a sonda mutada no putativo TATA Box (figura21).

A



B

Sonda *Pbfks1(a)*: ATTACGAGCTACACCTCTCTCCTATATAGCCCGT**CGAAGGAAGAAGAGAAAT**

Competidor Mut1(TATA): ATTACGAGCTACACCTCTCTCCCCCCGCCCGTCGAAGGAAGAAGAGAAAT

Competidor Mut2(HSE): ATTACGAGCTACACCTCTCTCCTATATAGCCCGTCGCCGCGCCGCGAGCCAT

Figura 21. Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética utilizando as sondas *Pbfks1(a)* mutadas e extrato protéico de micélio ou levedura de *P. brasiliensis* – (A) 1: sonda *Pbfks1(a)* livre; 2: sonda *Pbfks1(a)* + extrato de micélio; 3 e 4: sonda *Pbfks1(a)* + extrato de micélio + competidor específico 25X e 50X, respectivamente; 5 e 6: sonda *Pbfks1(a)* + extrato de micélio + competidor Mut1(TATA) 25X e 50X, respectivamente; 7 e 8: sonda *Pbfks1(a)* + extrato de micélio + competidor Mut2(HSE) 25X e 50X, respectivamente; 9: sonda *Pbfks1(a)* + extrato de levedura; 10 e 11: sonda *Pbfks1(a)* + extrato de levedura + competidor específico 25X e 50X, respectivamente; 12 e 13: sonda *Pbfks1(a)* + extrato de levedura + competidor Mut1(TATA) 25X e 50X, respectivamente; 14 e 15: sonda *Pbfks1(a)* + extrato de levedura + competidor Mut2(HSE) 25X e 50X, respectivamente. (B) Seqüência da sonda *Pbfks1(a)*, destacando em negrito o HSE, e sublinhado encontra-se um putativo TATA Box. Nas sondas *Pbfks1(a)* mutadas, os sítios modificados encontram-se em duplo sublinhado.

Conforme observamos na figura 21, a sonda *Pbfks1(a)* apresenta um retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato de micélio (poço 2) e com extrato de levedura (poço 9). Observamos que para as duas condições, o retardo é gradativamente abolido na presença do competidor em que o HSE encontra-se modificado (poços 7, 8, 14 e 15). Sakuray e Takemori (2007) demonstraram que a alteração de GAA por GCC em uma das unidades repetitivas de HSE do promotor de um gene de *S. cerevisiae* reduz drasticamente a atividade transcricional em ensaios de gene repórter. Em nosso trabalho, modificamos o sítio CGAAGGAAGAAGAGAAA para CGCCGGCCGCCGAGCC. Entretanto, observamos que mesmo com essa modificação a sonda continuou atuando como competidor. Visto que a modificação desse sítio não interfere no ensaio de competição, esse resultado revela que essa interação não está associada ao HSE. Observamos ainda que a interação não é abolida na presença do competidor em que o putativo TATA Box está modificado (poços 5, 6, 12 e 13), indicando que a modificação desse sítio impede a competição. Esse resultado sugere que a interação está ocorrendo no TATA Box.

O TATA Box é um elemento presente na estrutura do promotor onde se liga a proteína TPB (*TATA Binding Protein*) para que o complexo de iniciação da transcrição seja formado. A seqüência consenso para o TATA Box é TATAAA, mas observa-se que uma ampla variedade de seqüências pode atuar como TATA Box *in vivo* (revisto por Butler *et al.*, 2002). TBP é uma subunidade do fator de transcrição basal TFIID, e em *S. cerevisiae* essa subunidade foi purificada preferencialmente como um único polipeptídeo do que como um complexo multiprotéico. Em geral, o TATA Box é localizado entre 25 a 30 pb a montante do sítio de iniciação da transcrição, e mutações no TATA Box podem reduzir ou abolir a atividade promotora (revisto por Smale e Kadonaga, 2003). Porém, observa-se que o TATA Box não é um componente universal dos promotores e que não apenas TBP, mas também fatores a ele associados podem mediar a iniciação da transcrição governada pela RNA polimerase II (revisto por Muller *et al.*, 2007). Entretanto, a dificuldade de identificação de motivos funcionais compromete a compreensão da estrutura e função promotora na regulação do respectivo gene. Nessa perspectiva, a identificação de elementos funcionais no promotor do gene *Pbfks1* poderá contribuir para a compreensão da regulação de promotores em *P. brasiliensis*.

4.2.2 – Análise da Expressão do Gene 1,3-β-glicana sintase de *P. brasiliensis*

Em *P. brasiliensis*, o conteúdo de 1,3-β-glicana é maior na parede celular de micélio, enquanto que o conteúdo de 1,3-α-glicana é superior na parede celular de levedura (Kanetsuna *et al.*, 1972). Marques *et al.* (2004) relataram que nesse organismo a expressão de 1,3-α-glicana sintase é maior na levedura do que no micélio. Nesse sentido, analisamos os níveis do transcrito do gene 1,3-β-glicana sintase nas fases de micélio e levedura de *P. brasiliensis* utilizando a técnica de RT-PCR em Tempo Real. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Análise da diferença entre os níveis de transcrito do gene *Pbfs1* em micélio e em levedura de *P. brasiliensis* – A análise da expressão foi realizada por RT-PCR em Tempo Real utilizando RNA obtido de culturas de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Como controle interno, foi realizada a amplificação do gene constitutivo L34 de *P. brasiliensis*. A análise dos dados de amplificação foi realizada utilizando-se o método $\Delta\Delta Ct$.

Gene	Fold Change	
	Micélio	Levedura
<i>Pbfs1</i>	2,5	1,0

Conforme observamos na tabela 6, os níveis do transcrito do gene *Pbfs1* foram maiores na fase micelial do que na fase de levedura. Esses resultados sugerem que a expressão do gene *Pbfs1* está correlacionada com a síntese de 1,3-β-glicana, visto que na parede celular de *P. brasiliensis* esse polímero predomina na forma de micélio.

Observamos que a região promotora do gene *Pbfs1* apresenta dois sítios para o fator de transcrição CreA, que reprime a expressão gênica na presença de glicose, e quatro sítios para o fator de transcrição FacB, requerido para crescimento em meio com acetato como fonte de carbono. Nessa perspectiva, verificamos também os níveis do transcrito do gene 1,3-β-glicana sintase em culturas de *P. brasiliensis* quando o fungo foi crescido em glicose ou em acetato de sódio por um período de 5 horas (tabela 7).

Tabela 7. Análise da diferença entre os níveis de transcrito do gene *Pbfks1* em glicose e acetato de sódio – A análise da expressão foi realizada por RT-PCR em Tempo Real utilizando RNA obtido de culturas de levedura de *P. brasiliensis* crescidas em glicose ou acetato 2%, por um período de cinco horas. Como controle interno, foi realizada a amplificação do gene constitutivo L34 de *P. brasiliensis*. A análise dos dados de amplificação foi realizada utilizando-se o método $\Delta\Delta C_t$.

Gene	Fold Change	
	Glicose	Acetato de Sódio
<i>Pbfks1</i>	2,0	3,7

Observamos na tabela 7 que os níveis do transcrito do gene 1,3- β -glicana sintase foram maiores após o crescimento em acetato de sódio. Mazur *et al.* (1995) relataram que em *S.cerevisiae* os níveis de mRNA de *FKS2* são maiores quando o fungo é crescido em acetato de sódio do que quando crescido em glicose. Dessa forma, sugerimos que o gene 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis* apresenta um comportamento transcricional semelhante ao descrito para *FKS2* de *S. cerevisiae*.

Pereira *et al.* (2000) relataram que os níveis de mRNA de *Pbfks1* não foram detectados por RT-PCR em culturas crescidas em meio com glicose. Nossos resultados demonstraram que a expressão de *Pbfks1*, apesar que após um período de cinco horas foi maior em acetato, também ocorre na presença de glicose. Ressaltamos que a RT-PCR em Tempo Real é uma metodologia que apresenta maior sensibilidade e, por isso, pode justificar a divergência na detecção dos transcritos.

4.2.3 – Sistema de Gene Repórter *lacZ* para Análise da Região Promotora do Gene 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis*

4.2.3.1 - Confirmação da Clonagem da Região Promotora do Gene *Pbfks1* no Vetor Gene Repórter

Para avaliar a atividade do promotor do gene *Pbfks1*, realizamos a transformação de *A. nidulans* com o vetor gene repórter contendo a região promotora do gene *Pbfks1*. Para confirmação da clonagem do inserto no vetor gene repórter, esse vetor foi digerido com a enzima de restrição *Bam* H1. Após a digestão, o vetor gene repórter liberou o inserto de

aproximadamente 800 pb (Figura 22), correspondente ao fragmento de DNA clonado. Dessa forma, confirmamos que o vetor utilizado contém o inserto de nosso interesse.

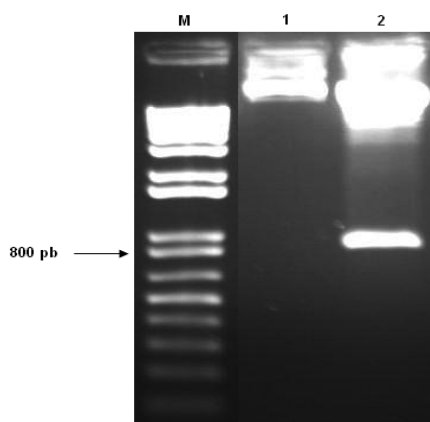


Figura 22. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) da digestão do vetor gene repórter (vetor 42B da série pAN923) contendo a região promotora do gene *Pbfks1* – M: marcador de massa molecular (1 Kb Plus DNA Ladder); 1: vetor intacto; 2: digestão do vetor com a enzima de restrição *Bam* H1, indicando um fragmento de DNA de aproximadamente 800 pb correspondente à região promotora do gene *Pbfks1* clonada no vetor gene repórter.

4.2.3.2 - Confirmação da Transformação de *A. nidulans* com o Vetor Gene Repórter Contendo a Região Promotora do Gene *Pbfks1*

Após a transformação de *A. nidulans* com o vetor gene repórter contendo a região promotora do gene *Pbfks1* e obtenção de transformantes estáveis mitoticamente, foi realizada a extração de DNA total dos transformantes. Empregamos a técnica de PCR para amplificar um fragmento do promotor do gene *Pbfks1*, a fim de confirmar a transformação. A figura 23 apresenta a análise eletroforética dos produtos obtidos pela PCR.

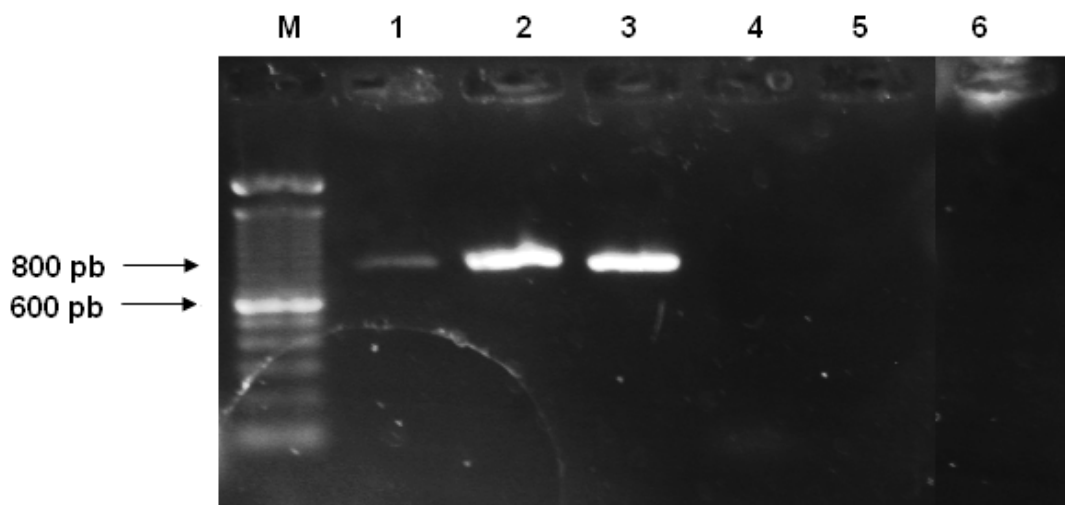


Figura 23. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) da amplificação de um fragmento do promotor do gene *Pbfks1* a partir do DNA dos fungos transformantes – M: marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder); 1, 2 e 3: amplificação a partir do DNA total dos transformantes B, C e D, respectivamente; 4: C-, correspondente à reação de PCR sem adição de DNA; 5: PCR a partir do DNA da linhagem *argB⁻* de *A. nidulans* (linhagem não transformada); 6: PCR a partir do DNA do fungo transformado com vetor sem conter o promotor do gene *Pbfks1* como inserto.

Observamos na figura 23 a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 800 pb, correspondente ao promotor do gene *Pbfks1* presente no DNA dos transformantes B, C e D. Verificamos também que o DNA do fungo transformado com vetor sem conter o promotor do gene *Pbfks1* como inserto, assim como o DNA da linhagem *argB⁻* de *A. nidulans* (linhagem não transformada), não apresentam amplificação correspondente ao promotor do gene *Pbfks1*, conforme o esperado. Dessa forma, confirmamos transformação de *A. nidulans* com o vetor gene repórter contendo a região promotora do gene *Pbfks1*.

4.2.3.3 - Análise da Atividade Promotora do Gene *Pbfks1* em Diferentes Fontes de Carbono

Avaliamos a atividade promotora do gene *Pbfks1* utilizando o sistema de gene repórter *lacZ* em *A. nidulans* para verificar diferenças na produção da β-galactosidase quando os transformantes foram crescidos em glicose e acetato de sódio como fontes de carbono. Entretanto, não detectamos a atividade de β-galactosidase nos ensaios em placa (dados não mostrados).

Em *S. cerevisiae*, as proteínas Fks1p e Fks2p, codificadas pelos genes *FKS1* e *FKS2*, respectivamente, parecem ter regulações opostas. Durante o crescimento em glicose, a expressão de *FKS1* é alta e a de *FKS2* é baixa; durante a esporulação, em que a principal fonte de carbono é o acetato, a expressão de *FKS1* é baixa e a de *FKS2* é alta. Mazur *et al.* (1995) mostraram que a expressão de *FKS2* em *S. cerevisiae* predomina durante o crescimento em acetato, e que os níveis de mRNA decrescem quando o acetato é substituído por glicose. Nossos resultados de RT-PCR em Tempo Real sugerem um comportamento de *Pbfks1* semelhante ao observado para *FKS2* de *S. cerevisiae*, visto que os níveis do transcrito do gene 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis* foram maiores em meio contendo acetato do que em meio contendo glicose. Segundo Zhao *et al.* (1998), a repressão por glicose em *FKS2* de *S. cerevisiae* é aparentemente regulada por Mig1p, homólogo de CreA. Foram identificados dois sítios de ligação para Mig1p no promotor de *FKS2*, ambos dentro de uma região necessária para a indução de *FKS2* em fontes pobres de carbono em ensaios de gene repórter. Além disso, mutantes que não expressam Mig1p apresentaram expressão de *FKS2* em níveis elevados quando cultivados em meio contendo glicose. Observamos que o promotor do gene *Pbfks1* apresenta dois sítios para o fator de transcrição CreA, e ressaltamos que foram identificados quatro sítios para o fator de transcrição FacB, requerido para crescimento em meio contendo acetato como fonte de carbono.

A atividade da β -galactosidase pode ser detectada pela visualização em placa da coloração azul dos transformantes, ou pela quantificação em meio líquido, em que os ensaios enzimáticos detectam a atividade de β -galactosidase na presença do substrato o-nitrofenil- β -D- galactopiranosídeo (ONPG). O sistema de gene repórter *lacZ* é atualmente amplamente empregado, e tem revelado dados sobre a regulação de genes de *Candida sp.* (BaeK *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2008; Lenardon *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2008), de *S. cerevisiae* (Zhao *et al.*, 2008) e *A. nidulans* (Hynes *et al.*, 2006). Entretanto, observa-se que a realização de ensaios em meio líquido é predominante. A quantificação enzimática da proteína repórter fornece uma estimativa da produção da proteína regulada pelo promotor em estudo mesmo em concentrações baixas, e permite a realização de comparações precisas das diferenças da atividade promotora em diferentes condições. Em nosso trabalho, realizamos a transformação de *A. nidulans* com o vetor gene repórter *lacZ* contendo o promotor do gene *Pbfks1*, confirmamos a transformação por meio da seleção de clones mitoticamente estáveis que apresentaram a marca de seleção auxotrófica, e verificamos por PCR a presença do promotor

do gene *PbfksI* no DNA dos transformantes. Realizamos o ensaio piloto para detecção da atividade de β -galactosidase em placa, mas nossos resultados são preliminares, e consideramos que a padronização de ensaios quantitativos poderão elucidar a atividade promotora do gene *PbfksI* no sistema de gene repórter *lacZ*.

5 – CONCLUSÃO

Em nosso trabalho, analisamos a região promotora dos genes *Pbchs4* e *Pbfks1*.

Por meio de EMSA, verificamos que a sonda *Pbchs4(b)*, que contém um sítio para o fator de transcrição CreA, não interage com o domínio de ligação ao DNA da proteína CreA de *H. grisea*, mas apresenta interações DNA-proteína específicas com proteínas do extrato protéico total obtido a partir das fases de micélio e levedura. Demonstramos também que a sonda *Pbchs4(a)*, que contém sítio para o fator de transcrição PacC e dois elementos de resposta ao estresse (STRE), não interage com o domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis*. A sonda *Pbchs4(a)* apresenta o nucleotídeo “G” na posição cinco da seqüência consenso reconhecida por PacC de *A. nidulans*. Embora a substituição de “A” por “G” nessa posição seja descrita como tolerada nesse organismo, PacC de *P. brasiliensis* não reconheceu esse sítio no promotor *Pbchs4*, mas demonstramos que a proteína recombinante PacCPb-GST é capaz de reconhecer sondas de *H. grisea* que apresentam o sítio GCCAAG, que apresenta “A” na quinta posição. Além disso, ensaios com sondas mutadas sugerem que uma interação específica que ocorre entre a sonda *Pbchs4(a)* e extratos protéicos das fases de micélio e levedura envolva o motivo STRE. Observamos que a sonda *Pbfks1(a)*, que contém um elemento de resposta ao choque térmico (HSE) e um TATA Box, apresenta uma interação DNA-proteína específica com extratos protéicos das fases de micélio e levedura. Ensaios com sondas mutadas sugerem que essa interação possa estar ocorrendo no TATA Box e não no HSE.

Em ensaios de gene repórter *lacZ* para análise do promotor do gene *Pbfks1* não foi possível detectar a atividade em placa de β -galactosidase, mas resultados de RT-PCR em Tempo Real revelaram que o transcrito do gene *Pbfks1* é mais abundante em meio contendo acetato do que em meio contendo glicose como fonte de carbono, sugerindo um comportamento semelhante ao descrito para *FKS2* de *S. cerevisiae*.

A análise dos promotores dos genes *Pbfks1* e *Pbchs4* realizada pelo nosso grupo de pesquisa fornece dados pioneiros sobre o estudo de promotores de *P. brasiliensis*, e a continuação dessas investigações poderão contribuir para a compreensão da regulação da

expressão gênica nesse patógeno, particularmente no tocante à biossíntese e remodelação da parede celular.

6 – PERSPECTIVAS

- ➔ Avaliar a atividade do gene repórter *lacZ* em meio líquido utilizando glicose e acetato para verificar o efeitos dessas fontes de carbono na atividade promotora do gene *Pbfks1*;
- ➔ Avaliar se os sítios para CreA e FacB identificados na região promotora do gene *Pbfks1* interagem com extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis* para determinar o possível papel desses fatores na regulação do promotor, visto que por meio de RT-PCR em Tempo Real observamos que o transcrito do gene *Pbfks1* é maior em meio contendo acetato do que em meio contendo glicose como fonte de carbono;
- ➔ Avaliar qual é o sítio de ligação presente na sonda *Pbchs4(b)* que está interagindo com proteínas dos extratos protéicos de micélio e levedura;
- ➔ Avaliar a atividade do gene repórter *lacZ* em meio líquido em condições de estresse osmótico para verificar o efeito dessa condição na atividade promotora do gene *Pbchs4*, e compreender a regulação no elemento de resposta ao estresse proposta neste trabalho;
- ➔ Avaliar se o sítio GCCAAG, que apresenta o nucleotídeo “A” na posição 5 e foi identificado na região intergênica dos genes *Pbchs4* e *Pbchs5*, interage com PacCPb-GST, a fim de elucidar a(s) seqüência(a) que pode(em) ser reconhecida(s) por PacC de *P. brasiliensis*.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, S.M. (2006) Análise estrutural e de expressão do gene *pacC* de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Editora UnB: Brasília, DF, 2003. 212 p.

Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA. (1994) GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol.* 14(6):4135-44.

Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, Lass-Flörl C.(2008) Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(10):3504-11.

Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. (1998) Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun.* 66(11):5587-91.

Baek YU, Li M, Davis DA. (2008) *Candida albicans* ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron limitation by the Rim101 and CBF transcription factors. *Eukaryot Cell.* 7(7):1168-79.

Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SM, McEwen JG. (2008) *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia.* 165(4-5):197-207.

Birren B, Fink G, Lander E. (2003) A white paper for fungal comparative genome. Submitted by The Fungal Genome Initiative Steering Committee.

Butler JE, Kadonaga JT. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. : *Genes Dev.* 16(20):2583-92.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 6(2):89-117.

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):130-80.

Conaway RC, Conaway JW. (1993) General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem.* 62:161-90.

Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. (2002) Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica.* 2002 18(5):1441-54.

Cubero B, Scazzocchio C. (1994) Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 15;13(2):407-15.

Denison SH. (2000) pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol.* 29(2):61-71.

Derengowski LS, Tavares AH, Silva S, Procópio LS, Felipe MS, Silva-Pereira I. (2008) Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol.* 46(2):125-34.

Díez E, Alvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suárez T, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* 15;21(6):1350-9.

Douglas CM, Foor F, Marrinan JA, Morin N, Nielsen JB, Dahl AM, Mazur P, Baginsky W, Li W, el-Sherbeini M, et al. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26):12907-11.

Eisman B, Alonso-Monge R, Román E, Arana D, Nombela C, Pla J. (2006) The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 5(2):347-58.

Espeso EA, Peñalva MA. (1994) In vitro binding of the two-finger repressor CreA to several consensus and non-consensus sites at the ipnA upstream region is context dependent. *FEBS Lett.* 342(1):43-8.

Espeso EA, Tilburn J, Sánchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN Jr, Peñalva MA. (1997) Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol.* 274(4):466-80.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuíno RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brígido MM; PbGenome Network. (2005) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem.* 280(26):24706-14.

Fornajeiro N, Maluf MLF, Takahachi G, Svidzinski TIE. (2005) Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(2):191-193.

Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. (1993) Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol.* 5:115-49.

Freitas FZ, Bertolini MC. (2004) Genomic organization of the *Neurospora crassa* gsn gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock. *Mol Genet Genomics*. 272(5):550-61.

Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Giannini MJ. (2002) Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect*.2(8):877-84.

Ha YS, Covert SF, Momany M. (2006) FsFKS1, the 1,3-beta-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. *Eukaryot Cell*. 5(7):1036-42.

Hsu KH, Lee GC, Shaw JF.(2008) Promoter analysis and differential expression of the *Candida rugosa* lipase gene family in response to culture conditions. *J Agric Food Chem*. 56(6):1992-8.

Hynes MJ, Murray SL, Duncan A, Khew GS, Davis MA.(2006) Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*. 5(5):794-805.

Ishiguro J, Saitou A, Durán A, Ribas JC. (1997) cps1+, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *J Bacteriol*. 179(24):7653-62.

Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev*. 9(13):1559-71.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. (1969) Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 97(3):1036-41.

Kanetsuna F, Carbonell LM. (1971) Cell wall composition of the yeastlike and mycelial forms of *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol*. 106(3):946-8.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. (1972) Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 110(1):208-18.

Kapteyn JC, ter Riet B, Vink E, Blad S, De Nobel H, Van Den Ende H, Klis FM. (2001) Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol*. 39(2):469-79.

Kelly R, Register E, Hsu MJ, Kurtz M, Nielsen J. (1996) Isolation of a gene involved in 1,3-beta-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. *J Bacteriol*. 178(15):4381-91.

Kellner EM, Orsborn KI, Siegel EM, Mandel MA, Orbach MJ, Galgiani JN. (2005) *Coccidioides posadasii* contains a single 1,3-beta-glucan synthase gene that appears to be essential for growth. *Eukaryot Cell*. 4(1):111-20.

Kim KY, Truman AW, Levin DE. (2008) Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol*. 28(8):2579-89.

Klimpel KR, Goldman WE.(1988) Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack alpha-(1,3)-glucan. *Infect Immun.*56(11): 2997-3000.

Kodadek T, Sikder D, Nalley K. (2006) Keeping transcriptional activators under control. *Cell.* 127(2):261-4.

Laniel MA, Béliveau A, Guérin SL. DNA-protein interactions: principles and protocols. *Methods in molecular biology*; v. 148 2^a Ed. Human Press Inc. New Jersey, 2001.

Latgé JP. (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol.* 66(2):279-90.

Lenardon MD, Lesiak I, Munro CA, Gow NA. (2008) Dissection of the *Candida albicans* class I chitin synthase promoters. *Mol Genet Genomics.* 281(4):459-71.

León M, Sentandreu R, Zueco J. (2002) A single FKS homologue in *Yarrowia lipolytica* is essential for viability. *Yeast.* 19(12):1003-14.

Lenouvel F, van de Vondervoort PJ, Visser J. (2002) Disruption of the *Aspergillus niger* argB gene: a tool for transformation. *Curr Genet.* 2002 Sep;41(6):425-32.

Lin, CJ, Barbosa AS. (2002) Técnica de análise da regulação da transcrição gênica e suas aplicações na endocrinologia molecular. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46:330-340.

Mager WH, De Kruijff AJ. (1995) Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev.* 59(3):506-31.

Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH.(2004) Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics.* 271(6):667-77.

Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15(9):2227-35.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Vega G, Taylor JW. (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 23(1):65-73.

Mazur P, Morin N, Baginsky W, el-Sherbeini M, Clemas JA, Nielsen JB, Foor F. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* 15(10):5671-81.

Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Watanabe T, Yamada-Okabe H. (1997) Cloning of the *Candida albicans*

homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol.* 179(13):4096-105.

Mühlschlegel FA, Fonzi WA. (1997) PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol.* 17(10):5960-7.

Müller F, Demény MA, Tora L.(2007) New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors. *J Biol Chem.* 282(20):14685-9.

Munro CA, Selvaggini S, de Bruijn I, Walker L, Lenardon MD, Gerssen B, Milne S, Brown AJ, Gow NA. (2007) The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 63(5):1399-413.

Nimrichter L, Rodrigues ML, Rodrigues EG, Travassos LR. (2005) The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.* 7(4):789-98.

Niño-Vega GA, Munro CA, San-Blas G, Gooday GW, Gow NA. (2000) Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 38(1):31-9.

Niño-Vega GA, Carrero L, San-Blas G. (2004) Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Med Mycol.* 42(1):51-7.

Okamoto HT, Soares CM, Pereira M. (2006) Comparative analyses of the structure of the 1,3-beta-glucan synthase gene in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Genet Mol Res.* 5(2):407-18.

Onishi J, Meinz M, Thompson J, Curotto J, Dreikorn S, Rosenbach M, Douglas C, Abruzzo G, Flattery A, Kong L, Cabello A, Vicente F, Pelaez F, Diez MT, Martin I, Bills G, Giacobbe R, Dombrowski A, Schwartz R, Morris S, Harris G, Tsipouras A, Wilson K, Kurtz MB. (2000). Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(2):368-77.

Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN Jr, Peñalva MA. (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9(13):1622-32.

Palmeiro M, Cherubini K, Yurgel LS. (2005) Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. *Scientia Medica.* 15(4) 274:278.

Panozzo C, Cornillot E, Felenbok B. (1998) The CreA repressor is the sole DNA-binding protein responsible for carbon catabolite repression of the *alcA* gene in *Aspergillus nidulans* via its binding to a couple of specific sites. *J Biol Chem.* 273(11):6367-72.

Pereira M, Felipe MS, Brígido MM, Soares CM, Azevedo MO. (2000) Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 16(5):451-62.

Poças-Fonseca, MJ. (2000). Regulação da expressão dos genes de celobiohidrolase de *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

Popi FAF, Lopes JD, Mariano M. (2002) GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol*. 218(1-2):87-94.

Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P, Vai M. (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggpldelta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 179(2):463-9.

Punt PJ, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, Soede RD, Pouwels PH, van den Hondel CA. (1990) Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* gpdA gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*. 93(1):101-9.

Ramón AM, Fonzi WA. (2003) Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. *Eukaryot Cell*. 2(4):718-28.

Rappleye CA, Goldman WE. (2006) Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol*. 60:281-303.

Rauscher R, Würleitner E, Wacenovský C, Aro N, Stricker AR, Zeilinger S, Kubicek CP, Penttilä M, Mach RL. (2006) Transcriptional regulation of xyn1, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell*. 5(3):447-56.

Read JT, Cheng H, Hendy SC, Nelson CC, Rennie PS. (2009) Receptor-DNA interactions: EMSA and footprinting. *Methods Mol Biol*. 505:97-122.

Restrepo A, Tobón AM, Agudelo CA. Diagnosis and Treatment of Human Mycoses In: Hospenthal DR e Rinaldi MG, editores. Infectious Disease. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007. p. 331-342

Rojo F. Mechanisms of transcriptional repression. (2001) *Curr Opin Microbiol*. 4(2):145-51.

Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 3. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

San-Blas G, San-Blas F. (1982) Effect of detergents on membrane-associated glucan synthetase from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 152(2):563-6.

San-Blas G. (1993) Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res*. 24(3):267-8.

San-Blas G, Niño-Vega G, Barreto L, Hebelar-Barbosa F, Bagagli E, Olivero de Briceño R, Mendes RP. (2005) Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 43(8):4255-7.

San-Blas G, Niño-Vega G. (2008) *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*. 165(4-5):183-95.

Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J.(2003) Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol*. 48(4):959-76.

Sant'Ana, LAM. (2008) Análise estrutural e funcional da região promotora do gene quitina sintase 4 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

Sakurai H, Takemori Y. (2007) Interaction between heat shock transcription factors (HSFs) and divergent binding sequences: binding specificities of yeast HSFs and human HSF1. *J Biol Chem*. 282(18):13334-41.

Santoro N, Johansson N, Thiele DJ. (1998) Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol*. 18(11):6340-52.

Schimoler-O'Rourke R, Renault S, Mo W, Selitrennikoff CP. (2003) *Neurospora crassa* FKS protein binds to the (1,3)beta-glucan synthase substrate, UDP-glucose. *Curr Microbiol*. 46(6):408-12.

Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. (1994) Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*. 140 (Pt 5):1189-94.

Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Tabora CP. (2006) Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect*. 8(1):197-205.

Smale ST, Kadonaga JT. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*. 72:449-79.

Schüller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H.(1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J*. 13(18):4382-9.

Tabora CP, da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. (2008) Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*. 165(4-5):331-9.

Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. (2006) *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol*. 59(5):1380-94.

Tavares AH, Silva SS, Bernardes VV, Maranhão AQ, Kyaw CM, Poças-Fonseca M, Silva-Pereira I. (2005) Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res.* 4(2):372-89.

Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. (2009) Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* [Epub ahead of print]

Telles FQ. (2008) Paracoccidioidomicose: uma importante descoberta. *Prática Hospitalar.* 58:23-25.

Thompson JR, Douglas CM, Li W, Jue CK, Pramanik B, Yuan X, Rude TH, Toffaletti DL, Perfect JR, Kurtz M. (1999) A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol.* 1999 Jan;181(2):444-53.

Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 26(2-3):205-21.

Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, Arst HN Jr. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14(4):779-90.

Todd RB, Andrianopoulos A, Davis MA, Hynes MJ. (1998) FacB, the *Aspergillus nidulans* activator of acetate utilization genes, binds dissimilar DNA sequences. *EMBO J.* 17(7):2042-54.

Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NA. (2008) Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* 4(4):e1000040.

West D. BCC Research. Wellesley, MA.; Publicado em março de 2007. Acesso em: fevereiro de 2009. Disponível em <http://www.bccresearch.com/report/PHM029B.html>.

van Gorcom RF, Punt PJ, Pouwels PH, van den Hondel CA. (1986) A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene.* 48(2-3):211-7.

Vautard G, Cotton P, Fèvre M. (1999) The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 453(1-2):54-8.

Yamamoto A, Mizukami Y, Sakurai H. (2005) Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 280(12):11911-9.

Zhao C, Jung US, Garrett-Engle P, Roe T, Cyert MS, Levin DE. (1998) Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol.* 18(2):1013-22.